



REC'D 13 SEP 2000

EP 00 / 07445

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Aktenzeichen: 199 35 433.2
Anmeldetag: 01. August 1999
Anmelder/Inhaber: Ferrarius Biotechnology GmbH,
Mannheim/DE
Bezeichnung: Mikrofluidischer Reaktionsträger
IPC: B 01 J, B 81 B, B 01 L

4

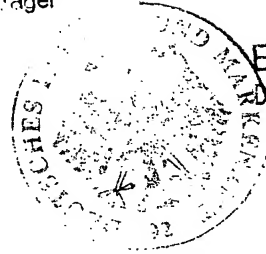
Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 24. August 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Joachim

Wassmayer

Beschreibung



Belegexemplar
Darf nicht geändert werden

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein mikrofluidischer Reaktionsträger, der je nach Ausführungsform eine rein fluidische oder auch eine lichtgesteuerte Synthese und Analyse von Oligomeren oder Polymeren ermöglicht. Es ist darüber hinaus
5 prinzipiell jede andere Anwendung als miniaturisierte chemische oder biochemische Synthese- und Analyseplattform beispielsweise zur Anwendung in der Kombinatorischen Chemie denkbar.

Mikrofluidische Systeme stehen allgemein noch am Anfang ihrer Entwicklung. Jedoch
10 stellen sie schon jetzt ein wichtiges Gebiet z.B. im Bereich der Mikropumpen oder Mikroventile dar. Der Schwerpunkt derzeitiger Arbeiten auf diesem Gebiet liegt in der Herstellung miniaturisierter Strukturen bevorzugt unter Einsatz von Verfahren aus der Halbleitertechnik.

Mikrodosiersysteme verknüpfen mikrominiaturisierte Pumpen und Ventile mit
15 Sensoren für Ansteuer- und Regelschaltungen. Solche Systeme werden derzeit für spezielle Anwendungen entwickelt und erprobt, z.B. für die Medikamentendosierung oder die Dosierung von kleinsten Flüssigkeitsmengen im Freistrahlf nach dem Prinzip eines Tintenstrahldruckers. Diese werden beispielsweise für die Herstellung von „Polymersonden-Arrays“ verwendet, indem verschiedene biochemische Substanzen
20 auf definierte Positionen eines Trägerkörpers aufgespritzt werden.

Die Vermischung von Medien in Mikrofluidsystemen, etwa in chemischen Mikroreaktoren oder in Bioreaktoren, aber auch in chemischen Analysesystemen ist bisher noch wenig untersucht. Besteht die Notwendigkeit einer sehr raschen Vermischung, so lassen sich jedoch durch den Einsatz speziell konstruierter
25 Wirbelstrecken, oder durch die Verwendung eines ebenfalls miniaturisierten Mischers sehr hohe Mischungsraten erzielen. Die Entwicklung von Mikromischern hat noch keine Marktreife erreicht und befindet sich größtenteils noch im experimentellen Stadium. Die Interaktion von Fluid und Wand, wie sie für den erfindungsgemäßen mikrofluidischen Reaktionsträger von Bedeutung ist, wurde bisher noch nicht näher
30 untersucht.

Die Realisierung kompletter Mikrofluidanalyse-Systeme wurde bisher nur in einigen Fällen durchgeführt, z.B. in Systemen zur Analyse des Schwermetallgehalts im Grundwasser. Für die Herstellung von Test- und Funktionsmustern solcher Mikrofluidanalyse-Systeme werden bevorzugt verschiedene etablierte Silizium-Technologien, wie zum Beispiel isotropes und anisotropes Ätzen, verwendet.

Ein großer Nachteil der Siliziumtechnik ist der relativ hohe Materialpreis. Deshalb werden aktuell verschiedene kostengünstige Technologien entwickelt, welche die Herstellung von Mikrostrukturen als „Wegwerfartikel“ erlauben. Drei dieser Verfahren sind Mikro-Spritzguß, miniaturisierte Heißprägeverfahren (hot molding) oder die sogenannte LIGA (Lichtinduzierte Galvanoabformung) Technik. Diese Verfahren erlauben im Versuchsstadium die Herstellung von Mikrostrukturen mit Abmessungen kleiner 1 µm.

Heute werden diese Entwicklungen beispielsweise in der DNA-Analytik angewendet. Hierbei ist das aktuelle Forschungsthema eine möglichst schnelle und daher hochparallele Detektion. Die Kombination von Hybridisierung als Nachweisprinzip und optischer Signaldetektion ist am weitesten fortgeschritten. In den USA wird die Entwicklung dieser miniaturisierten Detektions-Chips mit enormem Aufwand vorangetrieben. Die Leistungsfähigkeit in der Analyse liegt hier im Bereich von 10^4 bis maximal 10^5 Basen pro Stunde.

Ziel ist daher die Entwicklung einer Technologie, mit Hilfe deren man im Bereich von 10^8 und mehr Basen pro Stunde analysieren und die ermittelten Daten so aufbereiten kann, daß eine sinnvolle Interaktion zwischen Bediener und dem einzusetzenden Gerät möglich ist. Das Herzstück eines solchen Gerätes ist der Gegenstand dieser Erfindung und soll im folgenden als mikrofluidischer Reaktionsträger beschrieben werden. Dieser erfindungsgemäße Reaktionsträger soll beispielsweise das zentrale Bauteil von Systemen zur automatischen Fragmentsynthese und -analyse von Oligonukleotiden bzw. Polymeren darstellen. Ein solches System ist in der Patentanmeldung 19924327.1 beschrieben.

Der erfindungsgemäße Reaktionsträger beinhaltet eine Struktur aus Mikrokanälen unterschiedlicher Größe, Geometrie und Funktion. Ein Teil der Mikrokanäle dient der Fluidzufuhr und -abfuhr. Alle weiteren Kanäle dienen als Reaktionsbereiche, wobei je nach Anwendung optional auch Fluidreservoirs etc. in die Mikrostruktur integriert

- werden können. Der Reaktionsträger wird entweder in einer zwei- oder einer dreidimensionalen Struktur durchströmt. Die zweidimensionale Ausführungsvariante besteht aus mindestens jeweils einem Zuführungs- und einem Abführungs kanal in einer Strömungsebene. Diese beiden Kanäle sind durch mehrere etwa senkrecht hierzu verlaufende Kanäle verbunden, wobei diese senkrechten Verbindungskanäle als Reaktionsbereiche dienen. Die somit entstehenden Reaktionskanäle können ebenfalls wieder in kleinere Kanäle unterteilt sein, wobei jeder Reaktionskanal einen oder mehrere Reaktionsbereiche umfaßt. Diese Reaktionsbereiche können zum Beispiel entlang des Kanals angeordnet sein.
- 10 Die komplexere dreidimensionale Ausführungsvariante besteht aus drei Strömungsebenen. Die Zuführungskanäle sind jeweils zueinander parallel in einer ersten Strömungsebene und die Abführungskanäle jeweils zueinander parallel in einer dritten Strömungsebene angeordnet, wobei Zuführungs- und Abführungskanäle in einer senkrechten Projektion entweder parallel zueinander oder unter einem Winkel zueinander angeordnet sind, wobei dieser Winkel vorzugsweise annähernd gleich 90° gewählt wird. An den Kreuzungspunkten der Kanäle in deren senkrechter Projektion in der gewinkelten Anordnung oder entlang der Kanäle in der parallelen Anordnung sind außerdem senkrechte Kanäle angeordnet, die eine dritte Strömungsebene bilden und die Zuführungskanäle der ersten mit den Abführungskanälen der dritten Ebene verbinden. Diese Verbindungskanäle sind wesentlich enger als die Zuführungs- und Abführungskanäle. Damit wird ein Überströmen der Reaktionsbereiche in den Zuführungs- und Abführungskanälen ohne Eindringen von Fluid in die Reaktionskanäle ermöglicht. Mehrere Reaktionskanäle zusammen bilden einen Reaktionsbereich.
- 25 Damit sind die technischen Voraussetzungen für eine sehr schnelle, effiziente und damit kostengünstige Bereitstellung einer Vielzahl von Reaktionsbereichen geschaffen, zum Beispiel für die integrierte Synthese einer Vielzahl von Polymersonden und die Analyse einer Vielzahl von Polymerfragmenten mittels dieser Sonden.
- 30 In allen Ausführungsvarianten werden die Fluide aus den Reaktionsbereichen abgeführt, ohne daß dabei ein Kontakt dieser Fluide mit einem anderen Reaktionsbereich des gesamten Reaktionsträgers erfolgen würde. Dies ist vor allem

bei Reaktionen relevant, deren Abfallprodukte andere Reaktionsbereiche schädigen oder zerstören könnten.

Alle drei Varianten des erfindungsgemäßen mikrofluidischen Reaktionsträgers haben auf der Ober- und der Unterseite jeweils eine Deckschicht. Bei der zweidimensionalen Struktur sowie bei den parallelen Zuführungs- und Abführungschanälen der dreidimensionalen Struktur ist mindestens eine der Deckschichten transparent ausgebildet, um eine lichtgesteuerte Photoaktivierung in den einzelnen Reaktionsbereichen durch individuelle Belichtung z.B. mittels einer programmierbaren Lichtquellenmatrix zu ermöglichen wie sie in der Patentanmeldung 199 07 080.6 beschrieben ist. Alle drei Varianten werden bevorzugt mit zwei transparenten Deckschichten ausgeführt um eine permanente optische Prozesskontrolle im Reaktionsträger sowie die Messung von Nachweisreaktionen im Durchlicht zu ermöglichen.

Die komplexere dreidimensionale Struktur mit den um einen Winkel gedrehten Zuführungs- und Abführungschanälen ermöglicht das individuelle Bespülen jedes einzelnen Reaktionsbereiches aus den senkrecht angeordneten Mikrokanälen. Dies erfolgt indem jeweils ein Zuführungschanal mit Fluid gespült und an einem Abführungschanal Fluid abgeführt wird. Das Fluid fließt durch den Zuführungschanal in die senkrechten Mikroreaktionskanäle und durch den Abführungschanal wieder aus dem Reaktionsträger hinaus. Genauso können auch mehrere Reaktionsbereiche gleichzeitig und dies sogar mit unterschiedlichen Fluiden gespült werden. Damit erschließt der erfindungsgemäße mikrofluidische Reaktionsträger mit der durch die gewinkelte Anordnung bedingten "Kreuzstruktur" eine Vielfalt an Anwendungen aus der Kombinatorischen Chemie oder der DNA-Analytik.

25

Eine weitere Anwendung ist das abwechselnde Beströmen zunächst aller Zuführungs- und Abführungschanäle mit Einsatzstoffen, wobei die Funktion der Fluidzufuhr und -abfuhr der Zuführungs- und Abführungschanäle von Zyklus zu Zyklus wechselt. Wird beispielsweise jeder Kanal mit einem anderen Baustein einer zu synthetisierenden Polymersonde gespült, so kann durch die Anwendung der Kreuzstruktur in wenigen Zyklen eine große Vielfalt an Oligomer- oder Polymersonden in den einzelnen Reaktionsbereichen eines Reaktionsträgers erzeugt werden. Die Synthese beliebig

30

spezifischer Einzelsonden in einem Reaktionsbereich ist durch die zuvor beschriebene Einzelansteuerung eines Reaktionsbereiches in Ergänzung problemlos möglich. Damit bietet der erfindungsgemäße mikrofluidische Reaktionsträger mit der Kreuzstruktur die Möglichkeit zur effizienten naßchemischen Oligomersonden- oder
5 Polymersondensynthese von „Sonden-Arrays“. Diese Vorgehensweise soll im folgenden als fluidisches Multiplexen bezeichnet werden. Auch die In-situ-Synthese mittels Prozessüberwachung sowie die integrierte Synthese- und Analyse sind damit möglich.

Für die rein fluidische Reaktionssteuerung sind keine lichtdurchlässigen
10 Deckschichten notwendig, jedoch ebenfalls sinnvoll für die optische Prozesskontrolle und die Erfassung von Nachweisreaktionen. Die Detektion kann hierbei ebenfalls entweder im Durchlicht oder auch im Rücklicht von einer Seite erfolgen. Kombiniert man die dreidimensionale Kreuzstruktur mit ihren um einen Winkel gedreht angeordneten Zuführungs- und Abführungskanälen mit der lichtgesteuerten
15 Photoaktivierung der Reaktionsbereiche aus Mikrokanälen, so kann man die Effizienz der Synthese von Oligomer- oder Polymersonden noch weiter erhöhen. Sowohl die Lichtquellenmatrix als Lichtquelle als auch der benötigte Detektor können in den mikrofluidischen Reaktionsträger integriert werden. Gleiches gilt für die Integration einer CCD-Matrix als zweite, gegenüberliegende Deckschicht. Auch eine direkter
20 Anschluß einer programmierbaren Lichtquellenmatrix als Deckschicht ist möglich. Dies ist insbesondere dann naheliegend, wenn der mikrofluidische Reaktionsträger als festes Bauteil in ein Gerät integriert ist und zwischen den Anwendungen z.B. chemisch gereinigt wird und nur zu Wartungszwecken gewechselt werden muß. Wird der mikrofluidische Reaktionsträger nach jeder Verwendung ausgewechselt, so ist
25 eine direkte Integration jedoch nicht sinnvoll. Vielmehr empfiehlt es sich dann, die Komponenten im System entsprechend anzuordnen.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist die Versorgung des mikrofluidischen Reaktionsträgers mit den entsprechenden Fluiden. Hierzu wurde ein ebenfalls
30 neuartiges, integriertes Ventilsystem konzipiert. Dies erlaubt eine schnelle Bereitstellung einer Vielzahl an Fluiden an den Zuführungs- und Abführungskanälen der Mikrostruktur.

- Dieses Fluidversorgungssystem ist für die Anwendung des erfindungsgemäßen mikrofluidischen Reaktionsträgers für den Aufbau von Oligomer- oder Polymersondenarrays in den Reaktionsbereichen konzipiert. Das Versorgungssystem gleicht sich in den Anschlüssen und Komponenten für die „oberen“ und die „unteren“
- 5 Zuführungs- und Abführungskanäle. Von der einen Seite her werden alle Kanäle individuell über ein im folgenden beschriebenes Multiplexventil versorgt. Am jeweils dazugehörigen anderen Kanalende werden alle Kanäle zusammengeführt, wobei diese Zusammenführung für die Zu- und Abführung bei einheitlicher Bespülung aller Reaktionsbereiche verwendet wird. Bei der Synthese von Oligomer- oder
- 10 Polymersonden in den Reaktionsbereichen sind dies alle Zyklen außer der Zuführung der spezifischen einzelnen Bausteine bestehend aus einem oder mehreren Nukleotiden. Will man alle Reaktionsbereiche erreichen und nicht spezifisch auswählen, so ist es besser, eine strömungsoptimierte Zuführung wie beispielsweise eine duale Verästelung zu wählen, als über das Multiplexventil mit dem höheren
- 15 Verschleppungsrisiko. Für das Zuführen der spezifischen Bausteine benötigt man jedoch das Ventil. Dieses verbindet die Mikrokanäle des Reaktionsträgers auf der einen Seite mit einer maximal gleich großen Anzahl an individuellen Tanks sowie einem Sammelanschluß auf der anderen Seite. In einer Position des Ventils wird jeweils ein Tank mit einem oder mehreren Kanälen des Reaktionsträgers verbunden.
- 20 Soll das Fluid eines Tanks in einem Zyklus in mehr als einen Kanal bzw. ein Kanalbündel des Reaktionsträgers gelangen, so wird erst ein Kanal und anschließend weitere Kanäle seriell versorgt. Der Sammelanschluß entspricht der Zusammenführung der Kanäle auf der jeweils gegenüberliegenden Seite des Reaktionsträgers. Er dient der effizienten Spülung von Ventil und Reaktionsträger.
- 25 Die Anschlüsse des mikrofluidischen Reaktionsträgers an seine Fluidversorgung und Fluidentsorgung ist ein wichtiges Element. Wird der Reaktionsträger in der spezifischen Anwendung immer wieder gereinigt und wiederverwendet, so kann eine aufwendiger Anschlußtechnik, beispielsweise an das Multiplexventil vorgesehen werden. Hierbei ist, insbesondere bei einer großen Anzahl von Kanälen, eine
- 30 Ausführung analog der Halbleiterprozessortechnik mit einer Vielzahl an kleinsten Kanälen in sogenannten "Beinen" möglich. Diese Ausführung hat strömungstechnisch den Nachteil der Gefahr von Ablagerungen in den Biegungen und Knicken der einzelnen Mikrokanäle. Hier kann eine Hinterspülung wie zur Vermeidung von

9

Verschleppungen vorgesehen werden. Bei der Anwendungsvariante, in welcher der Reaktionsträger nach jeder Anwendung ausgewechselt wird, sind schnelle und ohne Klebung dichtende Anschlüsse notwendig. Dabei kann zum Beispiel flächig an der Stirnseite des Reaktionsträgers mit durchgehendem biegungsfreiem Kanalverlauf
5 angeschlossen werden. Somit ist das Verschleppungsrisiko minimal. Eine zweite Alternative ist das Aufpressen der Unterseite des Reaktionsträgers auf die Fluidzuführung. Geeignete chemikalienbeständige Dichtungen sind dabei jeweils vorzusehen.

Der Aufbau des erfindungsgemäßen mikrofluidische Reaktionsträger erfolgt wie dies
10 auch in der Halbleiter-Mikrotechnik üblich ist in mehreren Schichten. Hierbei kann zwischen einer Einteilung der Mikrostruktur in funktionale Schichten und konstruktionsbedingte Schichten unterschieden werden.

Während es in einer zweidimensionalen Struktur mindestens drei funktionale Schichten gibt, besteht eine dreidimensionale Struktur aus mindestens fünf
15 funktionalen Schichten. Diese funktionalen Schichten sind nachfolgend näher beschrieben. In der Produktion lassen sich oft mehrere dieser funktionalen Schichten mittels geeigneter Herstellungsverfahren in eine konstruktionsbedingte Schicht integrieren.

Die funktionalen Schichten der zweidimensionalen Struktur enthalten eine mittlere
20 Strukturschicht, in welche die Mikroströmungsstruktur aus Kanälen, Reaktionsbereichen und Reservoirs eingebracht ist. Sie wird mit einer oberen und einer unteren Deckschicht verbunden und kann aus Glas, Kunststoff oder Silizium beschaffen sein. Je nach Ausführung kann das verwendete Material transparent oder auch lichtundurchlässig sein. Beispielsweise empfiehlt sich als lichtundurchlässiges
25 Material Futoran-Glas der Firma Schott, Silizium oder Teflon.

Die dreidimensionalen Strukturen bestehen aus fünf funktionalen Schichten. Einer ersten, „oberen“ Deckschicht, einer darunterliegenden Struktur aus Mikrokanälen für die Fluidzuführung und Abführung in zur zweidimensionalen Struktur analogen Weise, einer mittleren Ebene aus senkrechten, (bevorzugt um mindestens den Faktor 10) kleineren Mikrokanälen, welche als Reaktionsbereiche dienen. Auf der „Unterseite“
30 schließen sich wieder eine Ebene für Fluidversorgung und eine Deckschicht an, die beide analog zur „Oberseite“ ausgebildet sind. Insgesamt ist der Reaktionsträger

74

spiegelbildlich zu einer mittleren Ebene aufgebaut. Die Herstellung muß sich nicht unbedingt nach den funktionalen Schichten richten. So ist eine Integration der Zuführungs- und Abführungsstruktur sowohl in der mittleren Schicht als auch in der Deckschicht möglich. Für die mittlere Schicht mit den senkrechten Mikrokanälen als Reaktionsbereiche können beispielsweise geeignete Silizium-Wafer aus der Halbleitertechnik mit geätzten „Poren“ der Firma Siemens oder zusammengesmolzene Glasfasern (Fiberglas-Wafern) der Firma Schott mit herausgeätzten Seelen und einem Größenverhältnis zwischen Wandstärke und Kanalquerschnitt von vorzugsweise 1 zu 5 verwendet werden. Um die exakte Bespülung nur der „angesteuerten“ Reaktionskanäle zu verbessern, kann die mittlere funktionale Ebene durch eine obere und eine untere Zwischenschicht ergänzt werden. Diese verhindert bzw. erschwert ein ungewollte Einströmen von Fluiden.

Die notwendigen Herstellungsverfahren unterscheiden sich je nach dem verwendeten Material. Bei Silizium-, Glas- und Fiberglaswafern (mit und ohne Seele) kommen als Verbindungstechniken Bonding-Verfahren zum Einsatz. Die Teile, wie zum Beispiel die verschiedenen Wafer, werden durch Ätztechniken sowie Sägen und Polieren hergestellt. Für die Verwendung von Kunststoffen wie Teflon, welches lichtundurchlässig ist, und COC oder Polystyrol, welches transparent ist, kommen Verfahren wie Spritzguß, Heißprägen oder LIGA zum Einsatz. Die Verbindung von Bauteilen erfolgt mittels Kleben oder Ultraschallschweißen.

Die obere Deckschicht schließt die darunterliegende Mikroströmungsstruktur nach außen ab. Hierdurch entstehen die Mikrokanäle. Für den Eintrag von Licht in diese Kanäle ist die Schicht lichtdurchlässig ausgebildet. Für eine optimierte Optik können auch Mikrolinsen in Glas der Firma Mikrogas oder Kunststoff (IMM Mainz) verwendet werden. Möglich ist ebenfalls der Einsatz einer Wabenstruktur aus zusammengesmolzenen Glasfasern, die z.B. von der Firma Schott oder ITT entwickelt wurde und beispielsweise bei Nachtsichtgeräten zum Einsatz kommt. Hierzu werden lange Glasfaserbündel so erhitzt, daß sie zusammenschmelzen und eine Einheit bilden. Auf diese Weise entsteht eine „Stange“, von welcher dann in zur Siliziumtechnologie analogen Weise dünne Scheiben abgesägt und poliert werden. Diese können anschließend mit Glas oder Silizium gebondet oder mit Kunststoffen verklebt bzw. verschweißt werden.

Der erfindungsgemäße mikrofluidische Reaktionsträger wird in seiner bestimmungsgemäßen Verwendung folgendermaßen eingesetzt: Zunächst wird eine Gruppe von Reaktionsbereichen durch die Mikrokanäle einer zwei- bzw. dreidimensionalen Mikrostruktur angesteuert. Nach der dort erfolgten Reaktion werden die in den einzelnen Reaktionsbereichen entstehenden Reaktionsprodukte durch Mikrokanäle abgeführt, ohne daß dabei die Reaktionsprodukte einen weiteren Reaktionsbereich durchströmen. Dabei kann eine Ansteuerung der Reaktionsbereiche in der beschriebenen dreidimensionalen Kreuzstruktur zur rein fluidischen Synthese von Oligo- oder Polymeren aus Mono-, Oligo- oder Polymeren, oder auch zur Beschleunigung der lichtgesteuerten Synthese von Polymeren durch das beschriebene intelligente Multiplexen der Einsatzstoffe genutzt werden.

Währenddessen erfolgt eine optische Kontrolle aller Reaktionsbereiche und Mikrokanäle durch transparente Deckschichten als Plattform für eine In-Situ-Synthese, eine permanente Prozesskontrolle und Regelung der Abläufe in der Mikrostruktur. Damit ist die Basis für eine umfassende Qualitätssicherung geschaffen. Lichtsignale von Nachweisreaktionen, welche in den Reaktionsbereichen durch chemische (z.B. Lumineszenz), biochemische (z.B. Biolumineszenz) oder lichtinduzierte (z.B. Fluoreszenz) Reaktionen entstehen, können in einem den fluidischen Mikroprozessor umgebenden integrierten Synthese- und Analyse-Gerät, wie es in der Patentanmeldung 19924327.1 beschrieben ist, erfaßt werden. Weiterhin möglich sind Absorptionsmessungen im Reaktionsträger durch die Erfassung von Lichtsignalen, welche die Mikrokanäle und Reaktionsbereiche im Durchlichtverfahren durchqueren oder im Rücklichtverfahren reflektiert werden. Dies kann zum Beispiel für eine erweiterte qualitative Qualitätssicherung genutzt werden.

Die Vorteile dieses erfindungsgemäßen mikrofluidischen Reaktionsträgers sind vielfältig: Zum einen werden die Reaktionsprodukte von jedem Reaktionsbereich abgeführt, ohne daß ein weiterer Reaktionsbereich mit den Reaktionsprodukten in Berührung kommt. Dies ermöglicht die Durchführung von Reaktionen für die Synthese und Analyse in den Reaktionsbereichen, welche Reaktionsprodukte (Endprodukte oder Zwischenprodukte) erzeugen, die für andere Reaktionsbereiche schädlich wären.

12

Im Vergleich zu planaren Flächen haben die dreidimensionalen Mikrokanäle eine größere als Festphase nutzbare Oberfläche.

Die Verwendung von Mikrostrukturen reduziert die für die Reaktionen benötigte Fluidmenge und erhöht gleichzeitig die Reaktionsgeschwindigkeit. Dies gilt sowohl für kovalente Bindungen wie auch zum Beispiel für die Hybridisierungszeiten bei Anwendungen in der DNA, RNA, PNA, LNA- Analytik oder bei Proteinanwendungen.

Durch transparente Deckschichten werden Photoreaktionen zum Beispiel für die lichtgesteuerte Synthese von DNA, RNA, PNA, LNA oder Proteinen, etc. ermöglicht.

Außerdem wird durch die transparenten Deckschichten eine permanente Prozesskontrolle für die Regelung der Reaktionen sowie der Fluidik im Reaktionsträger ermöglicht. Dadurch werden die Fehler sowohl bei der Produktion als auch bei der Detektion deutlich reduziert, womit sich die Zahl der auswertbaren Messungen pro Material- und Zeiteinsatz erhöht.

Durch eine geeignete Auslegung der Geometrie der einzelnen Reaktionsbereiche sowie der Mikrokanäle zwischen den Reaktionsbereichen lassen sich die Strahlengänge unter Berücksichtigung der auftretenden Brechungsindizes im Reaktionsträger gezielt beeinflussen.

Die erfindungsgemäßen fluidischen Mikroprozessoren können als einfache Komponenten für den einmaligen Gebrauch ausgeführt werden. Prinzipiell sind hier kostengünstige Kunststoff- Strukturen zu bevorzugen, aber auch Glas- und Silizium oder auch Materialkombinationen sind als Ausführungen möglich. Die schnelle und kostengünstige Produktion wird eine Vielfalt von individuellen Anwendungen ermöglichen, bei denen z.B. unter Berücksichtigung von Sequenz- und Gendatenbanken im Internet gezielt Sonden-Arrays synthetisiert und analysiert werden können.

Dabei finden die Reaktionen immer an den Wänden der Mikroreaktionskanäle statt. Folglich sind die Reaktionsbereiche immer dreidimensional ausgeprägt und haben eine erheblich größere Oberfläche als die planare Grundfläche. Durch diese dreidimensionale Geometrie ist also die nutzbare Reaktionsoberfläche stark vergrößert. Diese Größe der Oberfläche ist für die Verwendung als feste Phase von großer Bedeutung. Sie kann zum Beispiel für die Anlagerung von Oligonukleotiden

25

bei der Synthese im Reaktionsträger ebenso von Bedeutung sein wie für die Anlagerung von vorbeiströmenden Proben-Fragmente bei einer Analyse im Reaktionsträger.

Die dreidimensionale Kreuz- Struktur ermöglicht Anwendungen zum Beispiel in der Oligonukleotid- Analytik oder in der Kombinatorischen Chemie etc. Durch die Verwendung der beiden sich überkreuzenden Strukturen läßt sich schnell eine Vielzahl an unterschiedlichen Kombinationen von Oligomeren oder Polymeren in den individuellen Reaktionsbereichen des Reaktionsträgers erzeugen. Dadurch ist eine sehr effiziente naßchemische Synthese eines Oligomer- oder Polymersondenarrays in einem Reaktionsträger möglich. Dies kann computergesteuert erfolgen, wodurch die Erzeugung von beliebigen Nukleotidkombinationen in jedem Reaktionsbereich ermöglicht wird. Die Analyse kann ebenfalls direkt im Reaktionsträger erfolgen, wobei eine permanente Prozeßkontrolle möglich ist.

Durch ein entsprechendes Multiplexen der Fluide kann die Zahl der Herstellungszyklen von „Sondenarrays“ reduziert werden. Für die ortsspezifische Erzeugung einer Vielzahl unterschiedlicher Oligo- oder Polymersonden von beispielsweise 20 Basen Länge auf einer planaren Oberfläche mittels örtlicher Photoaktivierung benötigt man in jeder Ebene vier Synthesesyklen, was durch die vier verschiedenen Basen bedingt ist. Insgesamt werden also $4 \times 20 = 80$ Zyklen benötigt. Dabei besteht keine systematische Möglichkeit die Anzahl an Synthesesyklen zu reduzieren. Bei der Synthese im mikrofluidischen Reaktionsträger bietet sich hingegen die Möglichkeit, die Einsatzstoffe, also die Mono- oder Oligomere, gleichzeitig auf mikrofluidische Subbereiche zu verteilen. Dadurch lassen sich die Synthesesyklen bei Verwendung von Tetrameren beispielsweise auf minimal 5 Zyklen reduzieren. Die genaue Anzahl der für einen spezifischen Sondenarray benötigten Zyklen ist für jedes Sondenmuster individuell und kann nur als statistischer Mittelwert angegeben werden,

wenn die Anzahl an Reaktionsbereichen im Reaktionsträger, die Anzahl an parallelen fluidischen Subräumen und die Länge der zu synthetisierenden Oligomere vorgegeben ist.

Folgende Verfahren werden mit dem erfindungsgemäßen Reaktionsträger anwendbar: Neben der Synthese von Oligomeren und Polymeren bis zu ganzen Genen und Genomen bietet sich die Möglichkeit des "de novo"- Sequenzierens von

14

nicht bekannten Polymeren wie DNA, RNA, PNA, LNA, Proteinen und anderen durch einen Sequenzvergleich mit aufbereitetem Probenmaterial. Darüber hinaus möglich ist das „Re“- Sequenzieren von Polymeren, also der Vergleich von bekannten mit unbekannten Sequenzen, wobei die bekannten Sequenzen gezielt ausgewählt werden. Ebenfalls möglich ist die Herstellung von Substanzbibliotheken für Screening- und Analyseverfahren, insbesondere zur Nukleinsäure-Analyse über Hybridisierung.

In dem erfindungsgemäßen mikrofluidischen Reaktionsträger lassen sich alle Vorgänge von der Synthese bis zur Analyse einfacher oder komplexer Moleküle integrieren und diese sehr effizient durchführen. Dies ermöglicht zum Beispiel die flexible und kostensparende Analyse einer großen Zahl von Polymeren durch Bereitstellen einer Vielzahl von individuellen und spezifischen Polymersonden in miniaturisiertem Format mit anschließendem Vergleich der Sonden mit Analyten des Probenmaterials. Dadurch kann in Screening- und Analyseverfahren eine große Menge an Meßdaten erzeugt werden und somit die Informationsfülle biologischer Systeme effizient in kürzester Zeit ganzheitlich bewältigt werden.

Anwendungsfelder sind außerdem Verfahren und Geräte zur kontinuierlichen, diskreten Fragmentanalyse, welche durch die vorliegende Erfindung beschleunigt und damit effizient einsetzbar gemacht werden, sowie prinzipiell alle Anwendungen der Oligo/Polymeranalyse wie bei Liquid Chromatographie/High Pressure Liquid Chromatographie, Gaschromatographie, Dünnschichtchromatographie, Gelelektrophorese, Kapillarelektrophorese, Massenspektrometrie etc. sowie alle Anwendungen von „Sonden Arrays“. Weiterhin unterstützt wird damit die Substanzentwicklung und das Austesten von entsprechenden Substanzen u.a. in der Pharmaforschung. Weitere wichtige Anwendungsgebiete sind die Molekulare Diagnostik, DNA- und/oder RNA-Analyse, Screening nach molekularen Interaktionen beispielsweise in der Immunologie, Molekularbiologie, Histologie und Kombinatorischen Chemie.

Bei der Gestaltung gibt es ebenso wie bei der Fertigung der Reaktionsträger eine Vielzahl von Ausführungsvarianten, die in den folgenden Skizzen dargestellt sind:

Fig. 1a zeigt eine zweidimensionale Struktur des mikrofluidischen Reaktionsträgers in der Draufsicht. Fig. 1b und 1c zeigen die dazugehörigen Schnittdarstellungen: Die Mikrokanalstruktur 1 befindet sich in der mittleren Strömungsebene 30 des

Reaktionsträgers. Diese mittlere Strömungsebene wird von der unteren Deckschicht 10 und der oberen Deckschicht 20 abgeschlossen. Die Strömungsstruktur besteht aus Zuführungskanälen 2 und Abführungskanälen 3, sowie den dazwischenliegenden Reaktionskanälen 4 mit jeweils mindestens einem Reaktionsbereich.

5

Fig. 2a zeigt eine dreidimensionale Struktur des mikrofluidischen Reaktionsträgers in der Draufsicht. Fig. 2b, 2c und 2d zeigen die dazugehörigen Schnittdarstellungen: Die Mikrokanalstruktur 100 besteht aus der unteren Fluidzuführungsstruktur 32 mit den Mikrokanälen 102 und der oberen Abführungskanalstruktur 31 mit den Mikrokanälen 103. Dazwischen befinden sich in der mittleren Schicht 40 die annähernd senkrecht zur Zuführung und Abführung angeordneten Verbindungs- bzw. Reaktionskanäle in den Reaktionsbereichen 104. Die Deckschichten 20 und 30 sind wahlweise transparent oder lichtundurchlässig.

10

Fig. 3a, 3b und 3c zeigen nochmals die Darstellungen der Fig. 2a, 2b und 2c. Dabei verdeutlichen die Schnittdarstellungen den Strömungsverlauf durch die Zuführungskanäle 102, die Reaktionskanäle 101 in den Reaktionsbereichen 104 und die Fluidabführung 103.

15

Fig. 4a zeigt eine dreidimensionale Kreuzstruktur des mikrofluidischen Reaktionsträgers in der Draufsicht. Fig. 4b, 4c, 4d und 4e zeigen die dazugehörigen Schnittdarstellungen: Die Mikrokanalstruktur 200 befindet sich in der unteren Fluidzuführungs- und Fluidabführungsstruktur 32 mit den Mikrokanälen 202 und der oberen Fluidzuführungs- und Fluidabführungsstruktur 31 mit den Mikrokanälen 203, jeweils um 90° zueinander gedreht. Dazwischen befinden sich in der mittleren Schicht 40 die senkrecht zur Zuführung und Abführung angeordneten Verbindungs- bzw. Reaktionskanäle in den Reaktionsbereichen 204. Die Deckschichten 20 und 30 sind wahlweise transparent oder lichtundurchlässig.

20

1

25

Fig. 5a, 5b und 5c zeigen nochmals die Darstellungen der Fig. 4a, 4b und 4c. Dabei verdeutlichen die Schnittdarstellungen der Mikrostruktur 200 den Strömungsverlauf durch die Zuführungs- und Abführungskanäle 202 und 203, sowie die Reaktionskanäle 201 in den Reaktionsbereichen 204.

30

5 Fig. 6 zeigt die Darstellung einer einzelnen zweidimensionalen Strömungsstruktur analog Fig.1 mit veränderten Querschnitten der Zuführungskanäle 2 und der Abführungskanäle 3 zur gezielten Strömungsbeeinflussung. Die Reaktionskanäle 4 mit jeweils mindestens einem Reaktionsbereich sind hier im Querschnitt unverändert, können aber auch modifiziert werden.

10 Fig.7a zeigt analog zu Fig.6 eine einzelne zweidimensionale Strömungsstruktur mit in der Höhe der Kanäle veränderten Querschnitten der Zuführungskanäle 2 und der Abführungskanäle 3 zur gezielten Strömungsbeeinflussung. Die Reaktionskanäle 4 mit jeweils mindestens einem Reaktionsbereich sind hier im Querschnitt ebenfalls verändert und nicht einheitlich in der Größe. Die Struktur wird durch die schräg angeordneten Deckschichten 10 und 20 geschlossen.

15 Fig. 8 zeigt die Darstellung einer dreidimensionalen Strömungsstruktur analog Fig. 2 und 3 mit veränderten Querschnitten der Zuführungskanäle 102 und der Abführungskanäle 103 zur gezielten Strömungsbeeinflussung. Die Reaktionskanäle in den Reaktionsbereichen 104 sind dabei in ihrer Größe unverändert.

Fig. 9 zeigt eine zu Fig. 8 analoge Darstellung, wobei die Reaktionsbereiche 104 entsprechender der Größe der Zuführungskanäle 102 und Abführungskanäle 103 unterschiedliche Größe aufweisen.

20 Fig.10a, 10b und 10c zeigen eine zu Fig. 3a, 3b und 3c analoge Darstellung, wobei sich die Zuführungskanäle 102 und die Abführungskanäle 103 in ihrer Höhe verändern und damit die Strömung beeinflussen. Die Reaktionsbereiche 104 und die Reaktionskanäle 101 sind, bedingt durch die Dicke der mittleren Strukturschicht 40, einheitlich lang.

25 Fig.11a, 11b, 11c, 11d und 11e zeigen eine dreidimensionalen Kreuzstruktur der Strömung in einer zu Fig. 4a, 4b, 4c, 4d und 4e und 5a, 5b und 5c analogen Darstellung mit veränderten Querschnitten der Zuführungskanäle 202 und Abführungskanäle 203 zur gezielten Strömungsbeeinflussung. Die Reaktionskanäle in den Reaktionsbereichen 204 sind dabei von unveränderter Größe.

30

Fig.12a zeigt die Darstellung der Fig. 5c der Kreuzstruktur mit zwei Detailvarianten 12b und 12c. Das Detail 12b stellt die Struktur aus den Deckschichten 10 und 20 sowie einer mittleren Schicht 40 mit den Reaktionsbereichen in den Reaktionskanälen 201 sowie den Zuführungskanälen 202 und den Abführungskanälen 203 dar. Im Detail 12c sind die Reaktionskanäle 201 aus der Variante 12b jeweils durch eine dreischichtige Mikrostruktur ersetzt. Diese umfaßt zwei Schichten 301 und 303 zur Glättung und Stabilisierung der Zu- und Abströmung 202 und 203 sowie einer eigentlichen Reaktionsschicht 302 aus weiteren Mikrokanälen oder beispielsweise einem Glasflies.

Fig.13 zeigt eine Anschlußvariante der Mikro-Kreuzstruktur 200 nach Fig. 4a, 4b, 4c, 4d, 4e und 5a, 5b und 5c mit zwei Mikroanströmungskanalvarianten 401 und 402. Beide Varianten verbinden einen Kanal für die Fluidversorgung 400 jeweils mit allen parallelen Kanälen 202 und 203 der beiden Ebenen. So können sämtliche Reaktionsbereiche 204 gleichzeitig auf verschiedenen Zu- und Abführungsvarianten mit Fluid gespült werden.

Fig.14 zeigt eine zu Fig.13 analoge Darstellung mit zwei in die Fluidversorgung integrierten Ventilen 500. Diese versorgen die Mikrokanalstruktur 200 über die Kanäle in der einen Ebene 202 und der anderen Ebene 203. Dadurch können die Reaktionskanäle in den Reaktionsbereichen 204 mit Fluid gespült werden. Es können ein, mehrere oder alle Reaktionsbereiche 204 gleichzeitig mit Fluid gespült werden. Durch die Ventilstellung und die Strömungsrichtung durch die Reaktionskanäle können schnell beliebige Fluidversorgungszyklen realisiert werden. Hierzu sind nur die Ventile 500 zu verstellen und mit Unter- oder Überdruck zu beaufschlagen. Auch die einheitlichen Zuführungen 400, hier mit der Kanalvariante 402, können in die Fluidzyklen integriert werden.

Fig.15a zeigt eine Ausführungsvariante des Ventils 500 aus Fig.14 mit weiteren Schnittdarstellungen 15b und 15c. Das Ventil ist horizontal in Mikrotechnik ausgeführt. Es besteht im wesentlichen aus einer Scheibe 509 und einer Platte 600. Die Platte ist mit der Mikrostruktur 200 über Kanäle 601 bis 604 verbunden, so daß wahlweise die Fluide der Zuführungskanäle bzw. der Mikrotanks hinter den Kanälen 501 bis 504 in die Kanäle 202 der Mikrostruktur gepumpt werden können. Die Zuordnung kann durch Drehen der Ventilscheibe

509 seriell verändert werden. Dieses Ventil 500 kann gemäß Fig.14 auch an beide Kanalstrukturen 202 und 203 der Kreuzstruktur 200 angeschlossen werden. Damit können die Reaktionskanäle individuell mit Fluid benetzt werden. Über eine zentrale Zuführung 510 im Ventil 500 werden analog zu den starren Zusammenführungen 401 und 402 aus Fig. 13 die einzelnen Mikrokanäle 601 bis 604 wahlweise verbunden, beispielsweise für einheitliche Bspülungen beim Reinigen oder anderen einheitlichen Schritten z.B. bei der orts aufgelösten Synthese im Reaktionsträger.

10 Fig.16a zeigt eine weitere Ausführungsvariante des Multiplexventils 500 mit der Schnittdarstellung 16b. Hier sind die einzelnen Versorgungskanäle 501 bis 516 kreisförmig um den Reaktionsträger 200 angeordnet. Das Prinzip entspricht Fig.15a, 15b, 15c. Es können damit jedoch mehr oder größere Anschlüsse realisiert werden. Die Scheibe 509 befindet sich wieder auf einer zweischichtigen Grundplatte 600 und 610.

15 Fig.17 zeigt einen fluidischen Reaktionsträger im Querschnitt, der durch eine Spannvorrichtung aufgenommen ist, die mit zwei gegenüberliegenden Spannbacken 701 und 702 mit einer integrierten Strömungsführung 703 versehen ist, wobei diese Strömungsführung in einer Strömungsebene 202 ohne Biegung etc. in den Kanälen auskommt. Die gleiche Anordnung ist auch für die Kanäle 203 möglich. Weiterhin dargestellt ist eine schmale Dichtfläche 705.

Fig.18 zeigt eine weitere Anschlußvariante mit Strömungsführung 703 mit Biegungen 704 in mindestens zwei Ebenen. Dargestellt ist weiterhin eine breite Dichtfläche 705 im Auflager 710.

25 Fig.19 zeigt eine weitere Anschlußvariante mit Strömungsführung 703 mit Biegungen 704 in mindestens zwei Ebenen. Mikrobeine 721 analog zu einem Prozessor aus der Halbleitertechnik verbinden den Aufnahmesockel 720 mit dem Reaktionsträger 200 bzw. den Kanälen 202. Die Kanäle 203 können analog angeschlossen werden. Eine Dichtung erfolgt durch die Mikrobeine 721 durch verkleben oder einstecken.

7P

5 Fig.20 zeigt am Beispiel der Mikrobeine 721 aus Fig.19 eine Hinterspülung 803 zur Vermeidung von Ablagerungen in einer Biegung der Strömung und der damit verbundenen Verschleppungsgefahr. Diese Mikrobeine 721 sind in dem Reaktionsträger in der unteren Deckschicht 10 verankert. Durch die zweite Reihe an Reinigungsbeinen 801 kann gezielt Flüssigkeit über die Kanäle 802 in die Ecken 803 gespült werden und dadurch eine Ablagerung vermieden bzw. beseitigt werden.

Patentansprüche

- 1 Mikrofluidischer Reaktionsträger mit einer Mehrzahl von Reaktionsbereichen, dadurch gekennzeichnet, daß dieser Reaktionsträger eine Strömungskanalstruktur für das Durchleiten von Fluiden enthält, wobei Zuführungskanäle und dazu
5 parallele Abführungskanäle durch zu diesen unter einem Winkel angeordnete Verbindungskanäle miteinander verbunden sind und besagte Verbindungskanäle als Reaktionsbereiche dienen.
- 2 Mikrofluidischer Reaktionsträger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß
10 die Strömungskanalstruktur aus drei Strömungsebenen besteht, wobei die Zuführungskanäle zueinander parallel in einer ersten Strömungsebene liegen und die Abführungskanäle zueinander parallel in einer dritten Strömungsebene liegen und zu diesen beiden Strömungsebenen senkrecht oder annähernd senkrecht die Verbindungskanäle mit den Reaktionsbereichen liegen.
- 3 Mikrofluidischer Reaktionsträger nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß
15 in einer zu der ersten und der dritten Strömungsebene senkrechten Projektion die Zuführungskanäle der ersten Strömungsebene die Abführungskanäle der zweiten Strömungsebene unter einem Winkel kreuzen.
- 4 Mikrofluidischer Reaktionsträger nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch
0 gekennzeichnet, daß jeder Strömungskanal individuell über ein Ventilsystem mit Fluid beströmt und entleert werden kann.
- 5 Mikrofluidischer Reaktionsträger nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Abführung des Fluids jedes Reaktionsbereichs ohne
Kontakt dieses Fluids zu den anderen Reaktionsbereichen erfolgt.
- 6 Mikrofluidischer Reaktionsträger nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch
25 gekennzeichnet, daß die Strömungskanalstruktur einseitig mit einer transparenten Deckschicht versehen ist.

- 7 Mikrofluidischer Reaktionsträger nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Strömungskanalstruktur beidseitig mit einer transparenten Deckschicht versehen ist.
- 5 8 Mikrofluidischer Reaktionsträger nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß die transparenten Deckschichten aus Glas oder Kunststoff bestehen und in diese Deckschichten eine Struktur von Mikrolinsen derart integriert ist, daß das einfallende Licht auf die Reaktionsbereiche fokussiert wird und das ausfallende Licht einer Nachweisreaktion entsprechend gebündelt wird.
- 10 9 Mikrofluidischer Reaktionsträger nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß die transparenten Deckschichten aus einer Vielzahl von parallelen verschmolzenen Glasfasern bestehen, welche derart zu einer transparenten Wabenstruktur ausgebildet sind, daß das ein- und ausfallende Licht parallelisiert und ein seitliches reflexionsbedingtes Ausbreiten des Lichtes in der Deckschicht verhindert wird.
- 15 10 Mikrofluidischer Reaktionsträger nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Wände zwischen den Zuführungskanälen und den Abführungskanälen lichtundurchlässig ausgeführt sind.
- 20 11 Mikrofluidischer Reaktionsträger nach einem der Ansprüche 2 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungskanäle aus einer Vielzahl von zusammengeschmolzenen Glasfaserbündeln bestehen, wobei die Glasfaserseelen herausgeätzt sind und somit Mikrokanäle bestehen.
- 12 Mikrofluidischer Reaktionsträger nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Glasfaserbündel mit herausgeätzten Seelen nur im Bereich der Reaktionsbereich angeordnet werden.
-
- 25 13 Mikrofluidischer Reaktionsträger nach einem der Ansprüche 2 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungsebenen aus einer Siliziumschicht bestehen, in welche eine Vielzahl von kleinen Kanälen geätzt wurde.

- 5 14 Mikrofluidischer Reaktionsträger nach einem der Ansprüche 2 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere Strömungsebenen so übereinander angeordnet werden, daß sich die Reaktionsbereiche in der zu den Strömungsebenen senkrechten Projektion nicht überlagern und individuell durch Licht photoaktiviert werden können und Licht ebenfalls ortsspezifisch für jeden der Reaktionsbereiche detektiert werden kann.
- 15 15 Mikrofluidischer Reaktionsträger nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß eine programmierbare Lichtquellenmatrix für die Synthese und Analyse in den Reaktionsträger integriert wird.
- 10 16 Mikrofluidischer Reaktionsträger nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß eine Detektionseinheit in Form einer CCD-Matrix in den Reaktionsträger integriert wird.
- 15 17 Verwendung eines mikrofluidischen Reaktionsträgers nach einem der Ansprüche 6 bis 16, wobei durch die transparente Deckschicht Lumineszenz- und Fluoreszenzmessungen im Rücklichtverfahren durchgeführt werden.
- 20 18 Verwendung eines mikrofluidischen Reaktionsträgers nach einem der Ansprüche 7 bis 16, wobei jeder Reaktionsbereich über eine programmierbare Lichtquellenmatrix Licht definierter Wellenlänge ausgesetzt wird und über besagtes Licht und besagte Fluidversorgung biochemisch funktionalisiert wird und gleichzeitig über die zweite transparente Deckschicht alle Vorgänge im Reaktionsträger optisch überwacht werden.
- 25 19 Verwendung eines mikrofluidischen Reaktionsträgers nach einem der Ansprüche 7 bis 16, wobei durch die beiden transparenten Deckschichten Lumineszenz- und ~~Fluoreszenzmessungen sowie Absorptionsmessungen im Durchlichtverfahren~~ durchgeführt werden.
- 20 20 Verwendung eines mikrofluidischen Reaktionsträgers nach einem der Ansprüche 1 bis 16 zur naßchemischen Synthese von Oligomer- oder Polymersonden wie DNA, RNA, PNA, LNA und anderen.

- 21 Verwendung eines mikrofluidischen Reaktionsträgers nach einem der Ansprüche 1 bis 16 zur integrierten Synthese und Analyse von Polymeren.
- 22 Verwendung eines mikrofluidischen Reaktionsträgers nach einem der Ansprüche 1 bis 16 zur optischen Analyse der Hybridisierung von Polymersonden mit komplementären Fragmenten.
- 23 Verwendung eines mikrofluidischen Reaktionsträgers nach einem der Ansprüche 1 bis 16 zur effizienten hochparallelen kombinierten naßchemischen und lichtgesteuerten Synthese von Oligomer- oder Polymersonden wie DNA, RNA, PNA, LNA, Proteinen und anderen sowie zur anschließenden optischen Analyse der Hybridisierung mit komplementären Fragmenten.
- 24 Verwendung eines mikrofluidischer Reaktionsträgers nach einem der Ansprüche 1 bis 16 zur lichtgesteuerten Synthese von Oligomer- oder Polymersonden wie DNA, RNA, PNA, LNA und anderen sowie zur anschließenden optischen Analyse der Hybridisierung mit komplementären Fragmenten.
- 25 Verwendung eines mikrofluidischen Reaktionsträgers nach einem der Ansprüche 1 bis 16 zur individuellen Benetzung und biochemischen Funktionalisierung jedes Reaktionsbereiches im Reaktionsträger.

Fig. 1b

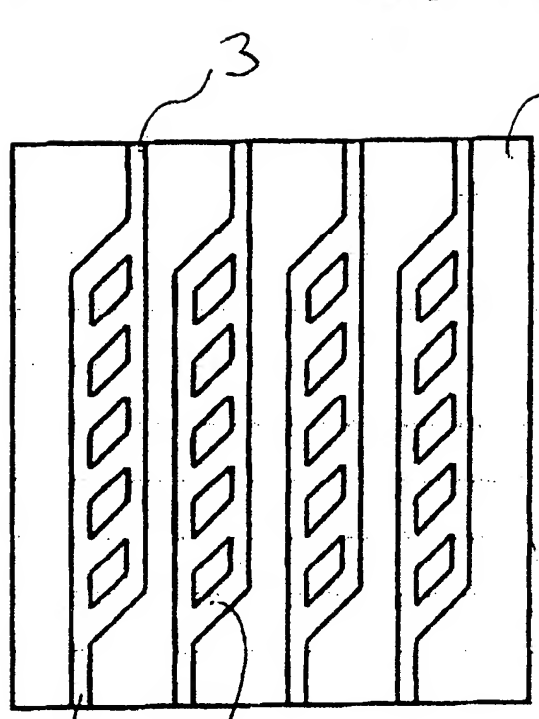
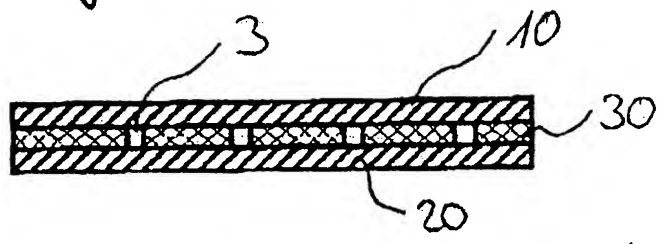
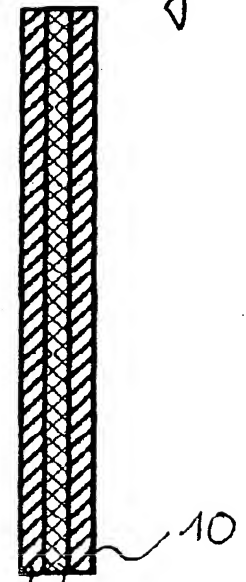


Fig. 1c



2 4

Fig. 1a

20 30

Fig. 2b

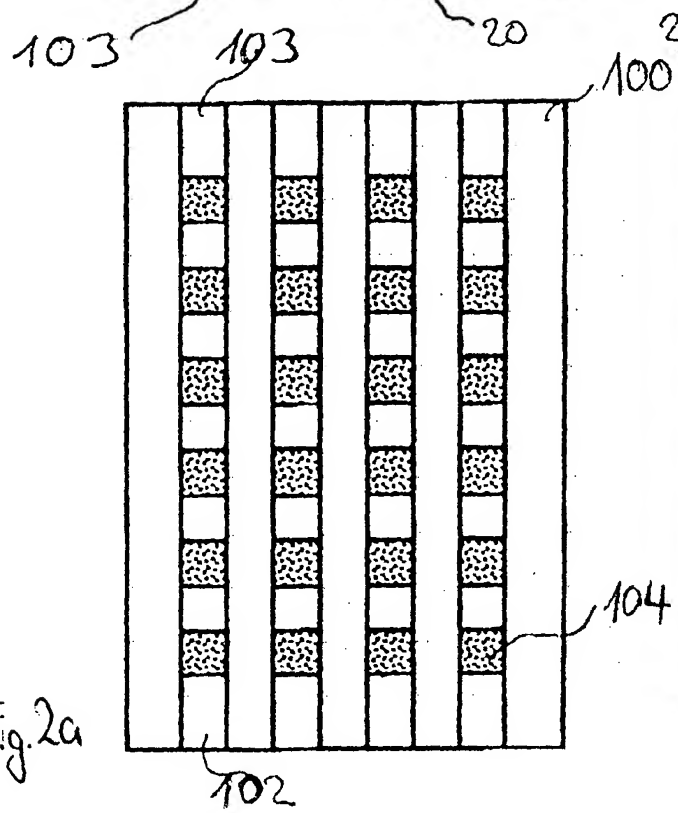
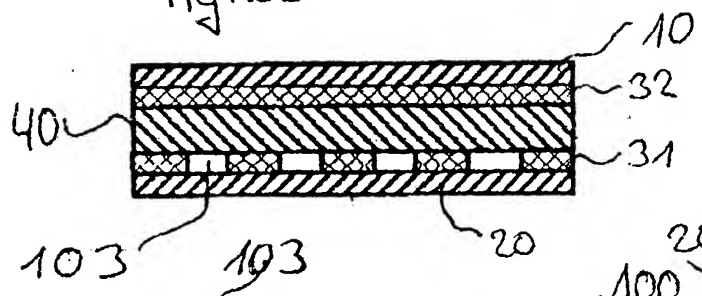


Fig. 2c

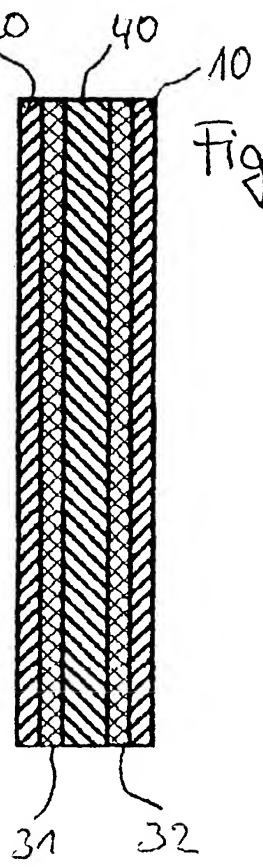


Fig. 2a

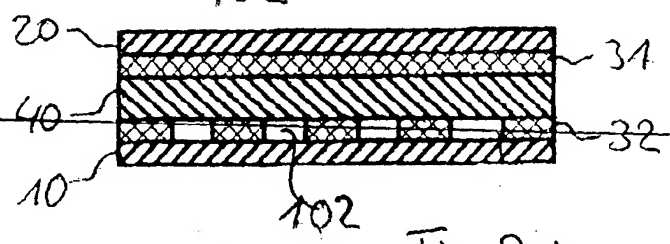


Fig. 2d

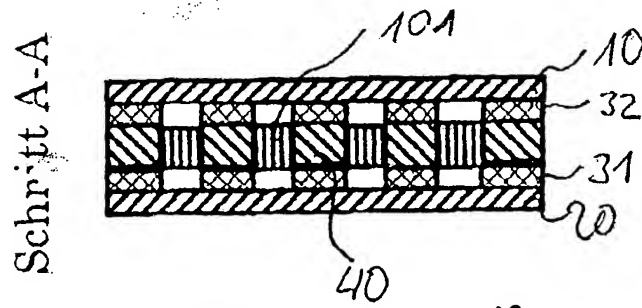


Fig. 3b

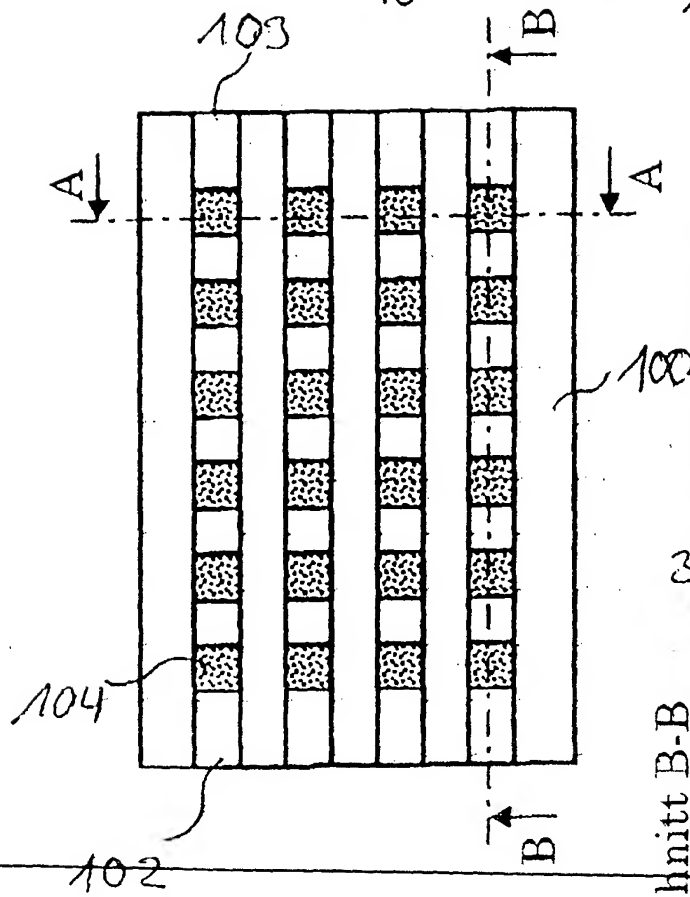


Fig. 3a

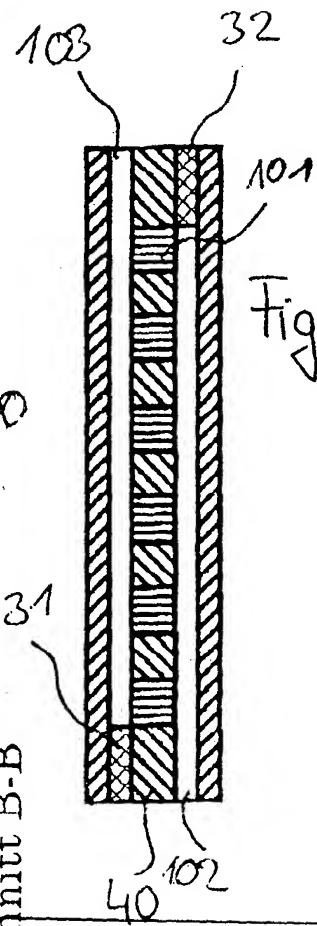
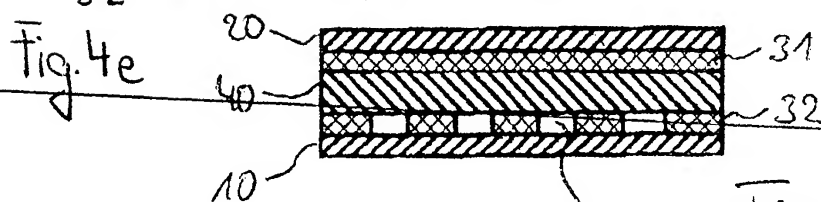
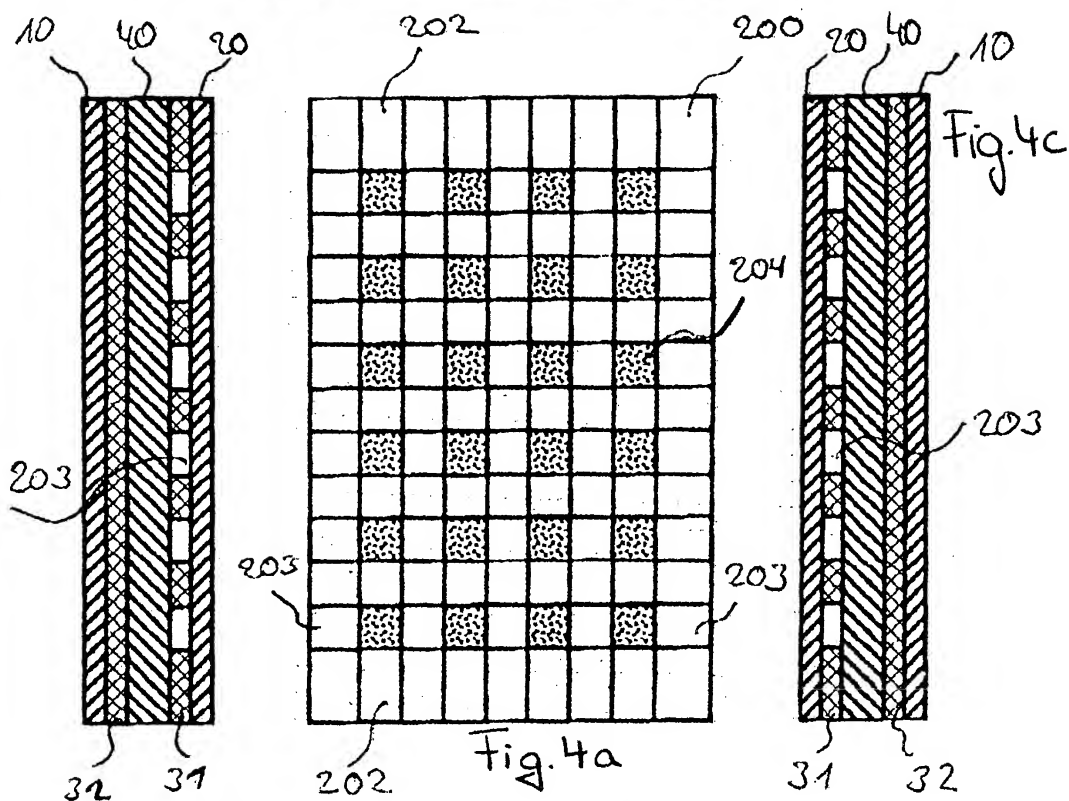
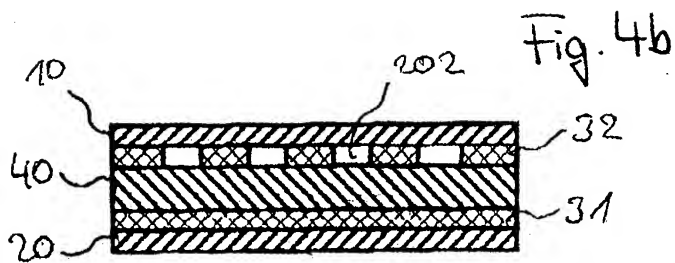
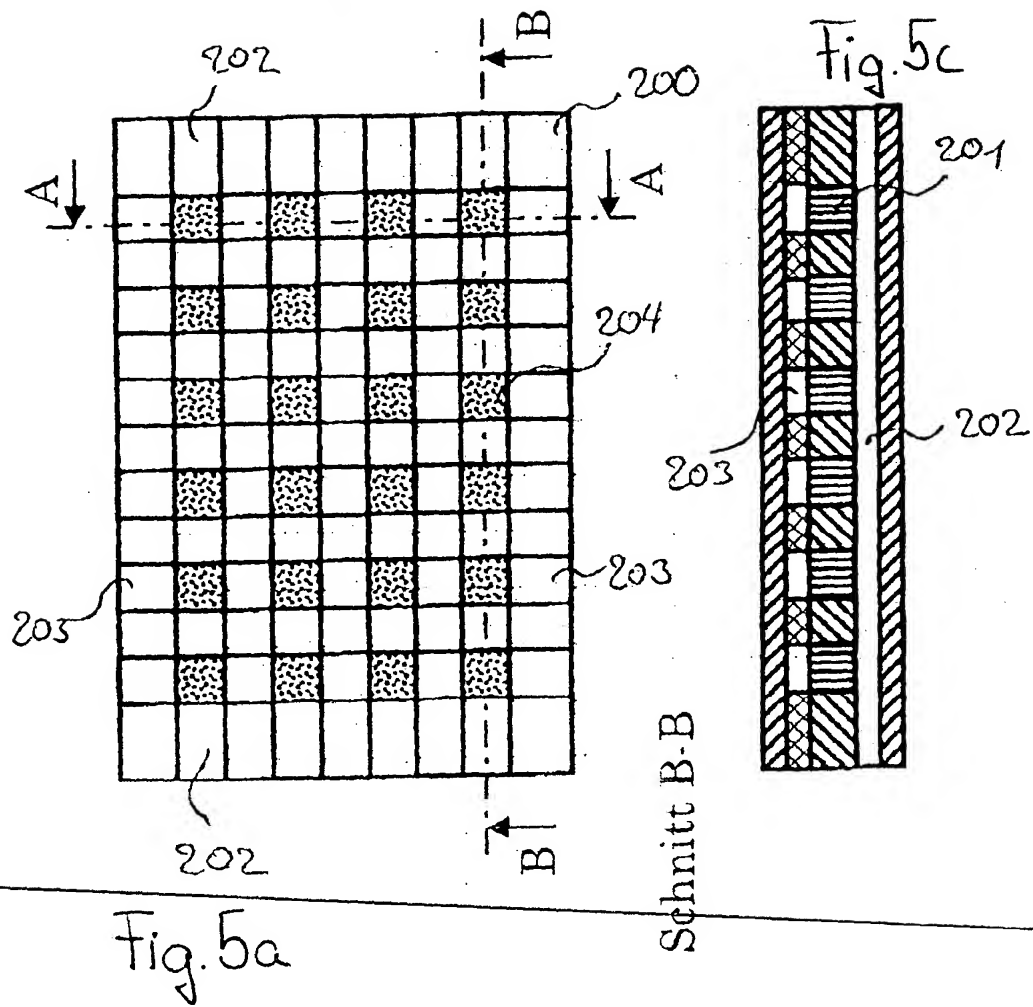
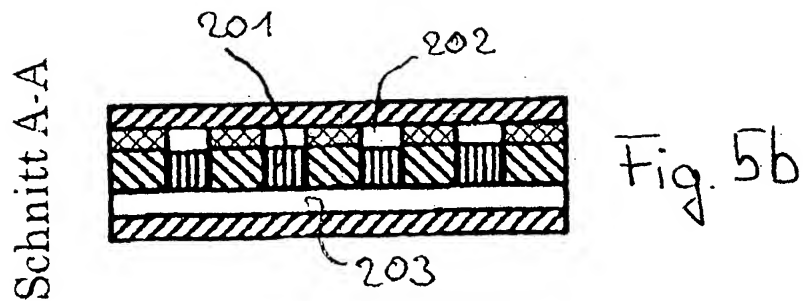


Fig. 3c





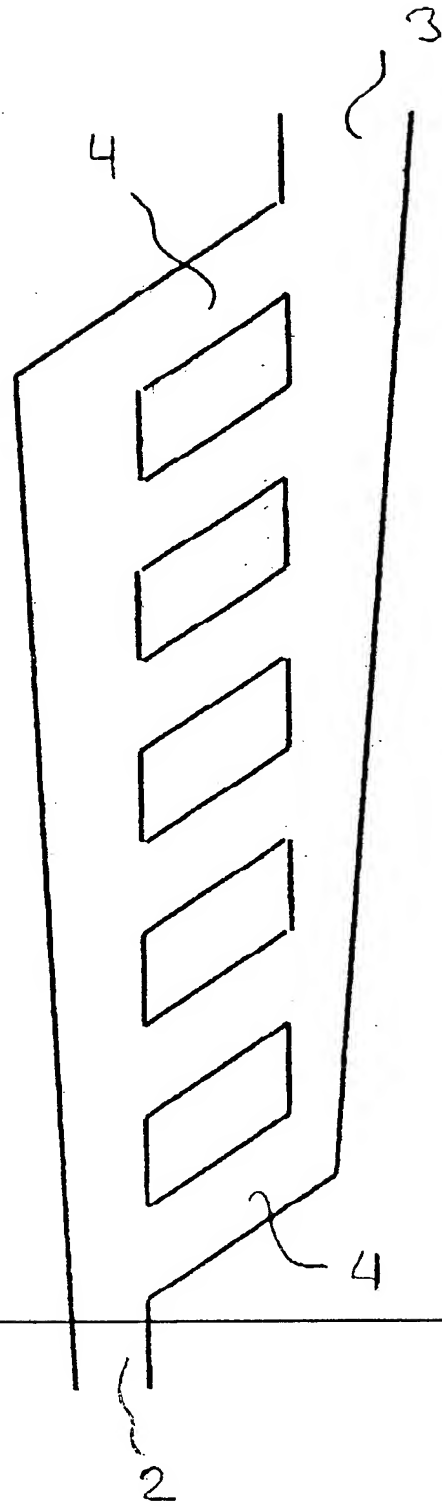
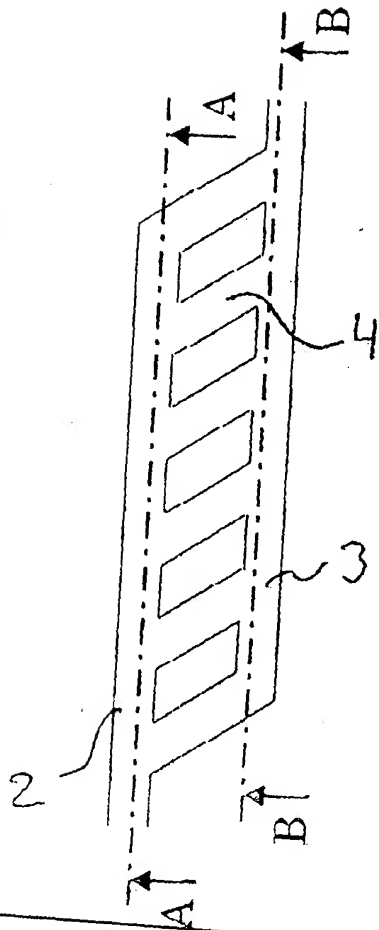


Fig. 6



Schnitt A-A

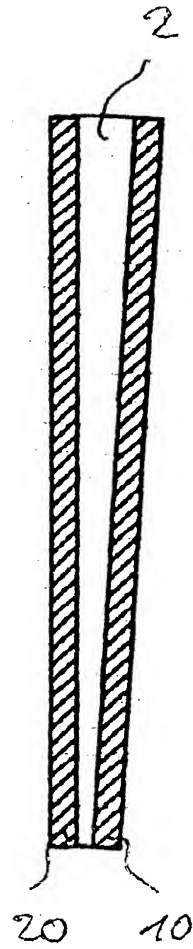


Fig. 7b

Schnitt B-B

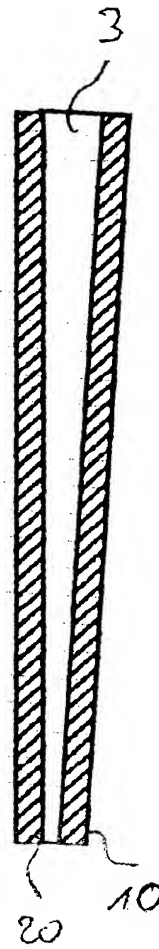


Fig. 7c

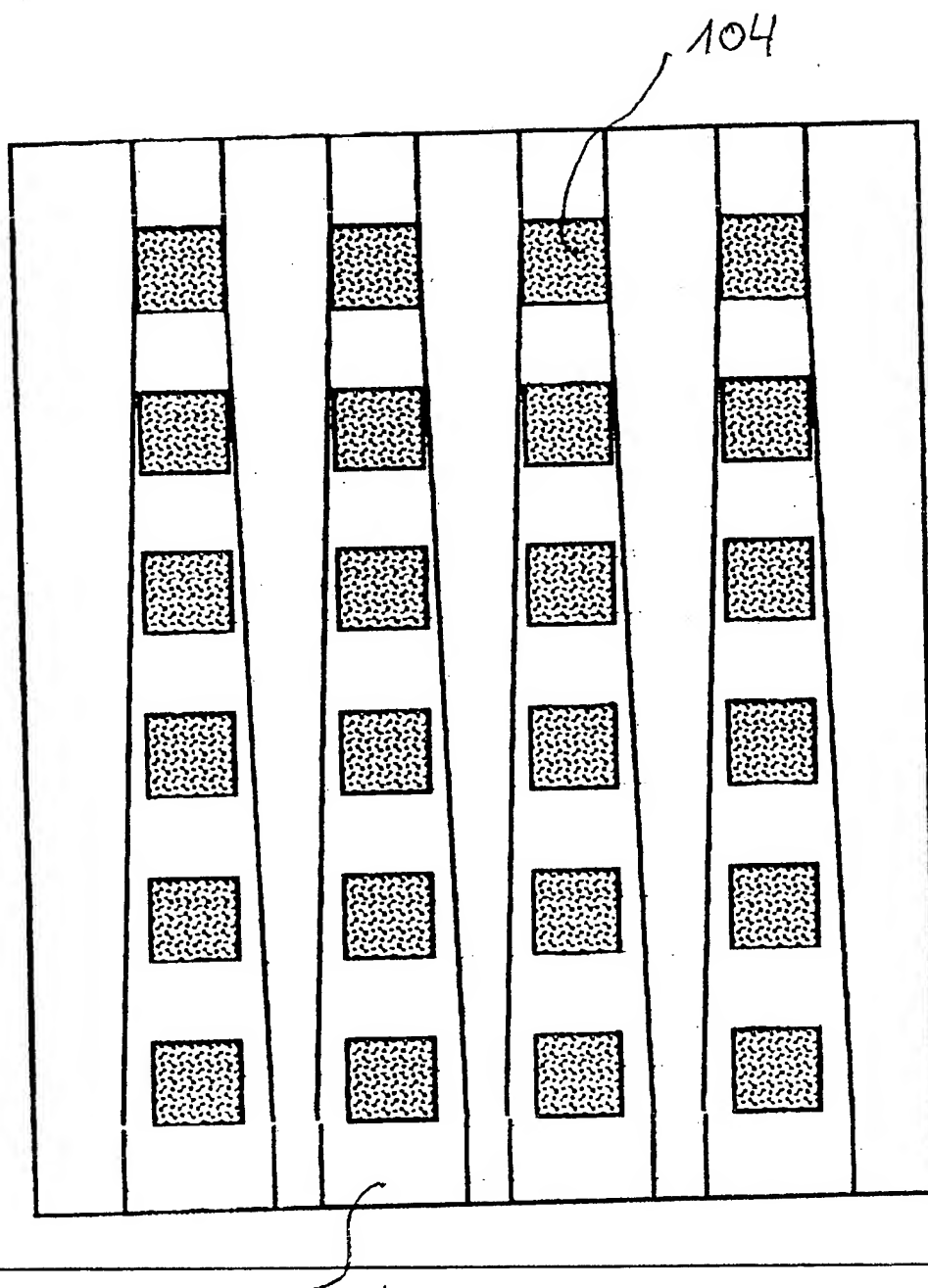


Fig. 8

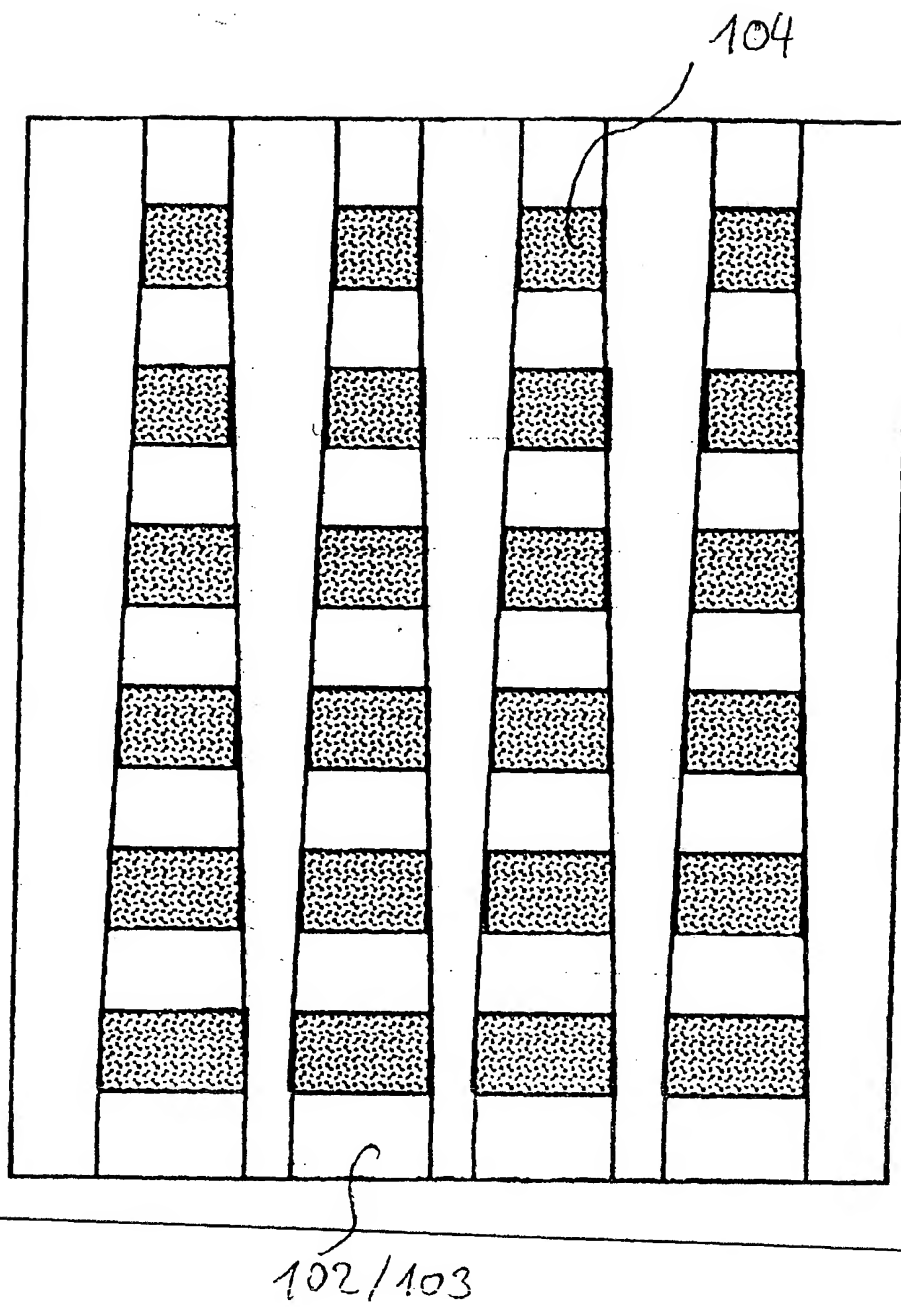


Fig. 9

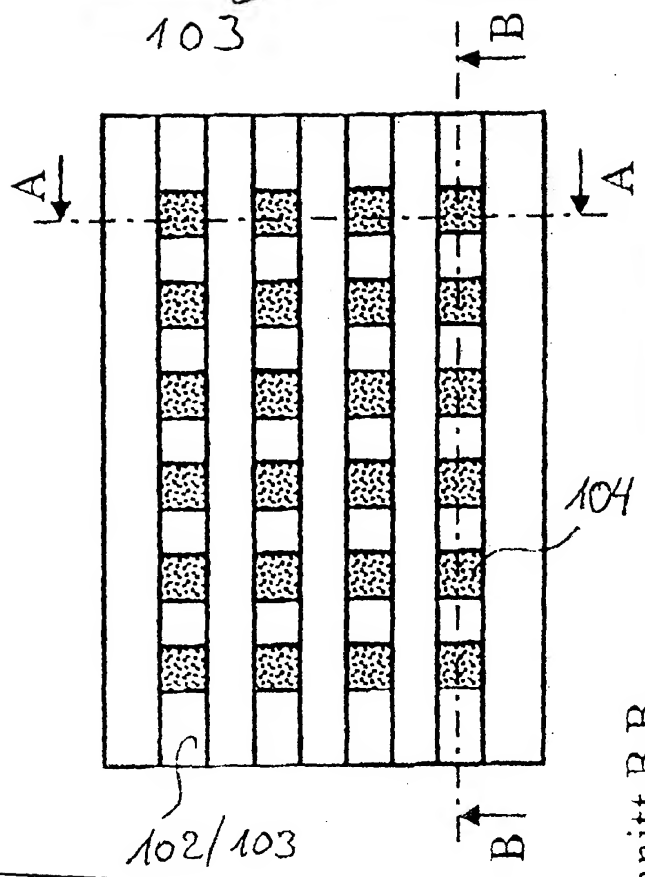
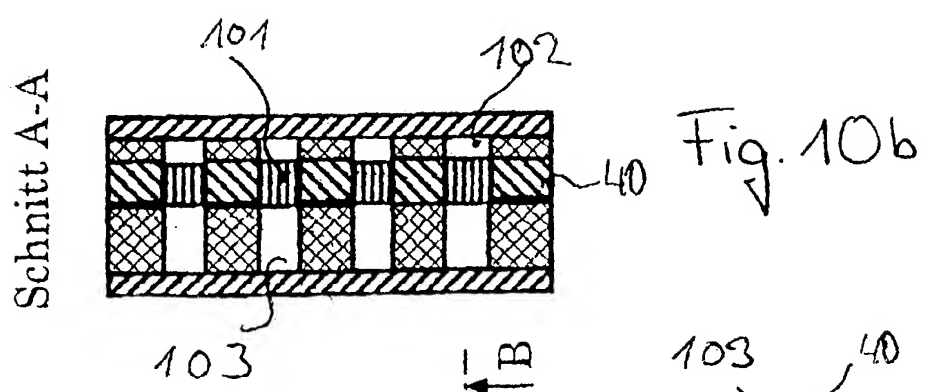
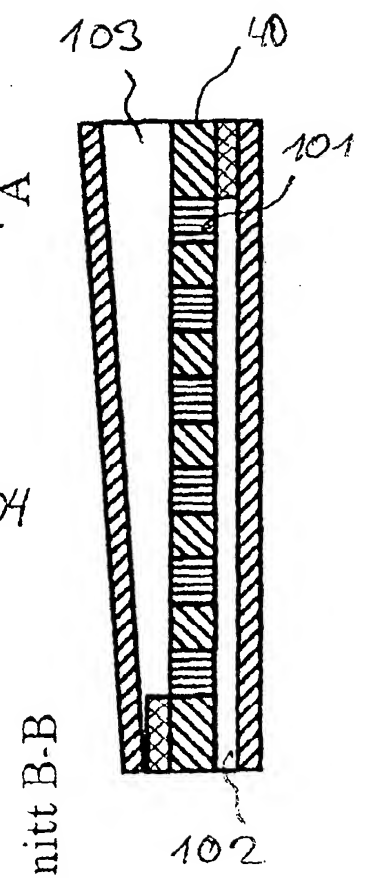


Fig. 10a



Schnitt B-B

Fig. 10c

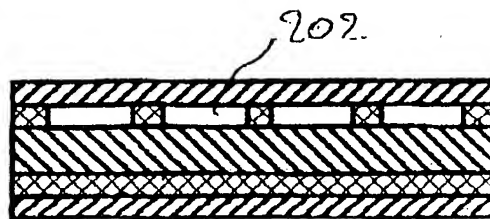


Fig. 11b

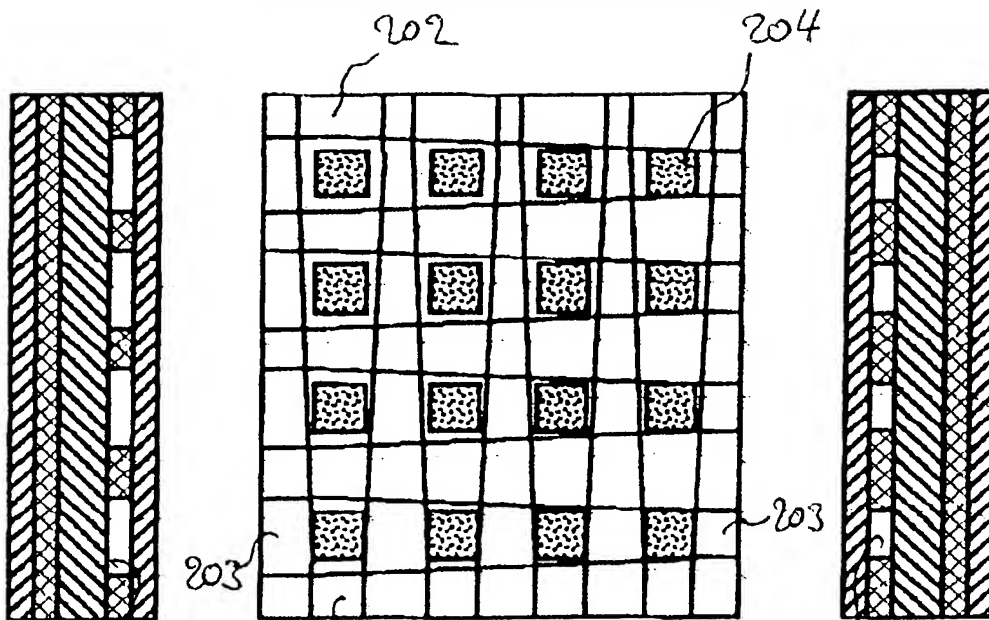
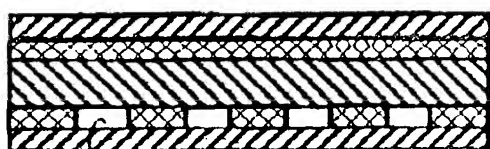


Fig. 11a

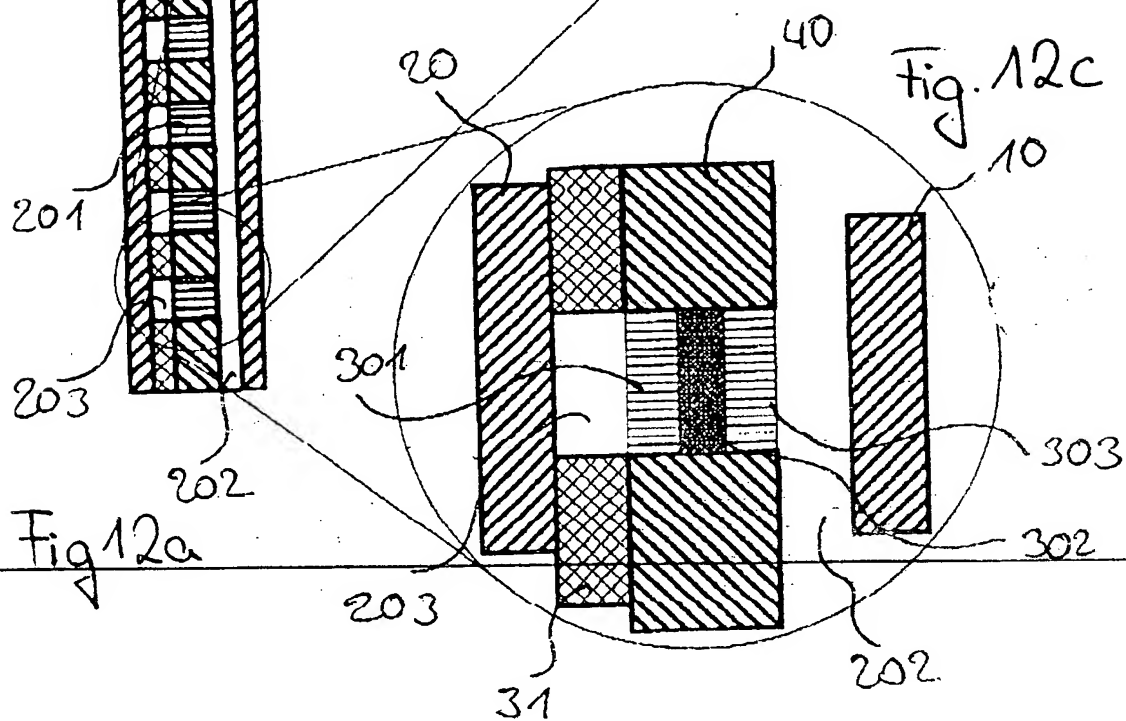
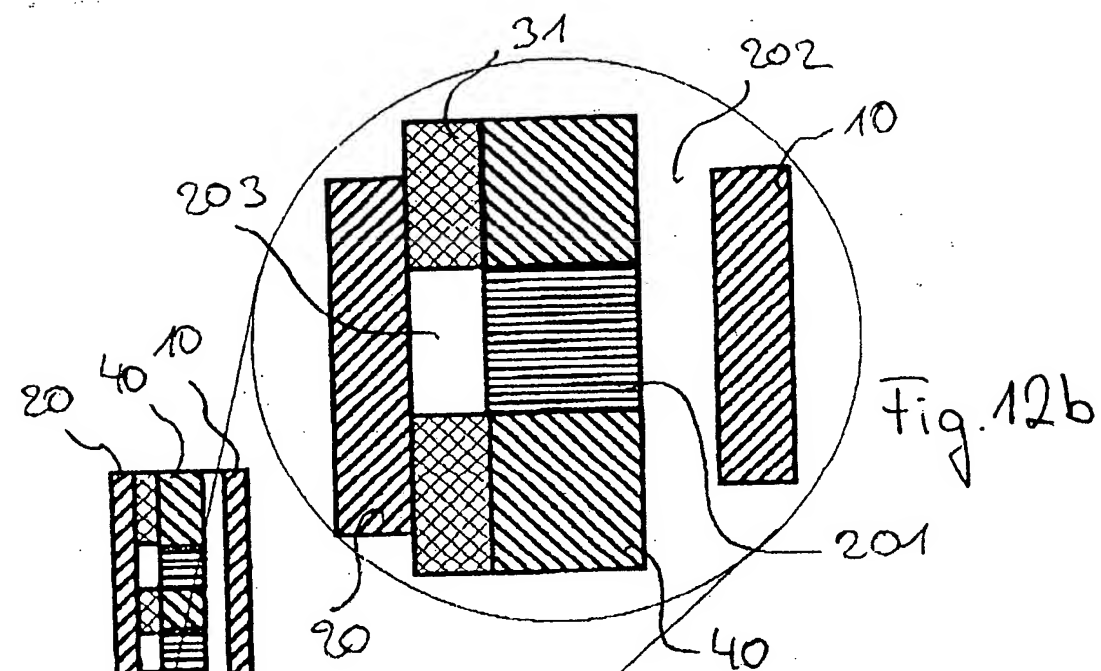
Fig. 11e

Fig. 11c



202

Fig. 11d



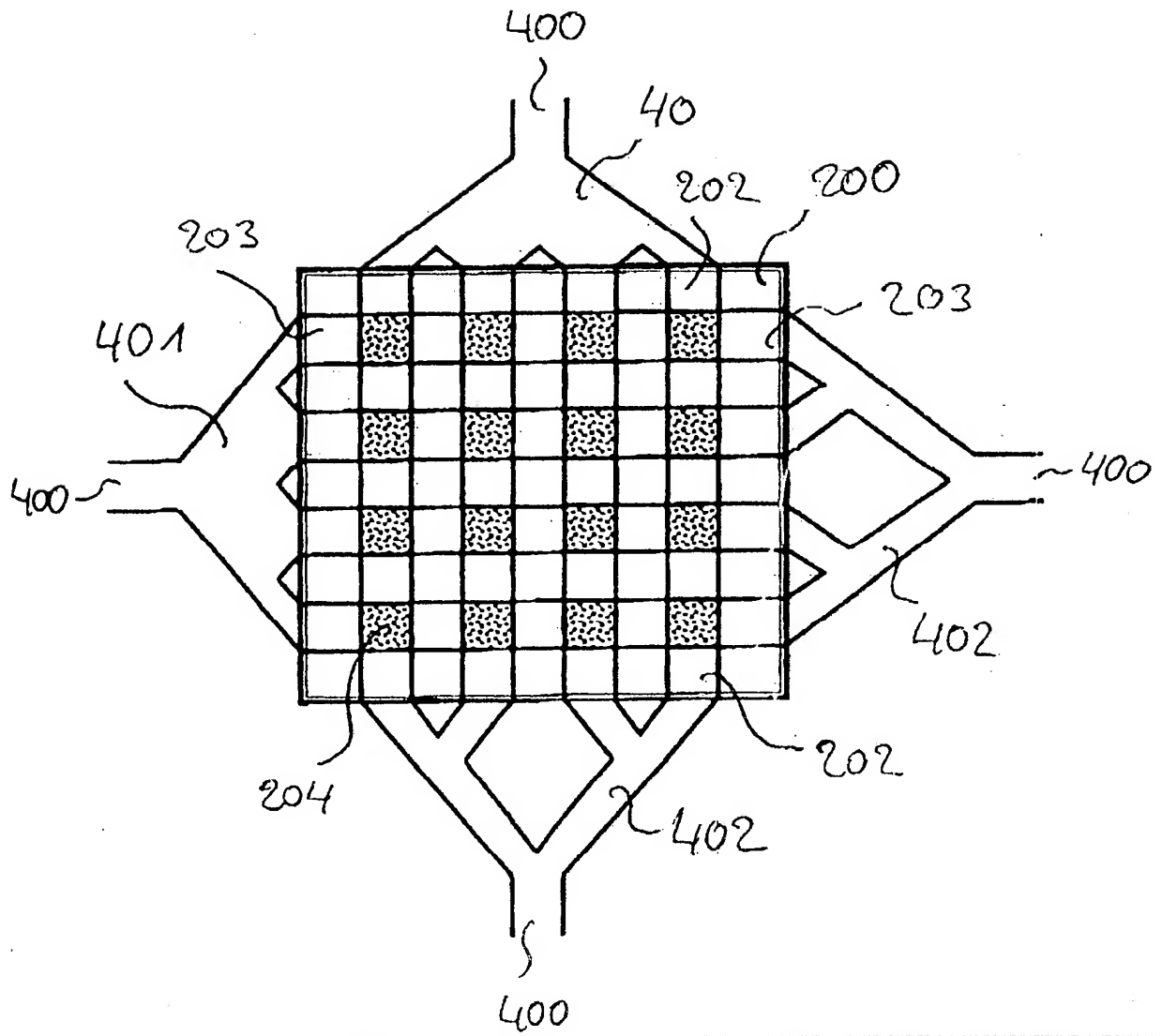


Fig. 13

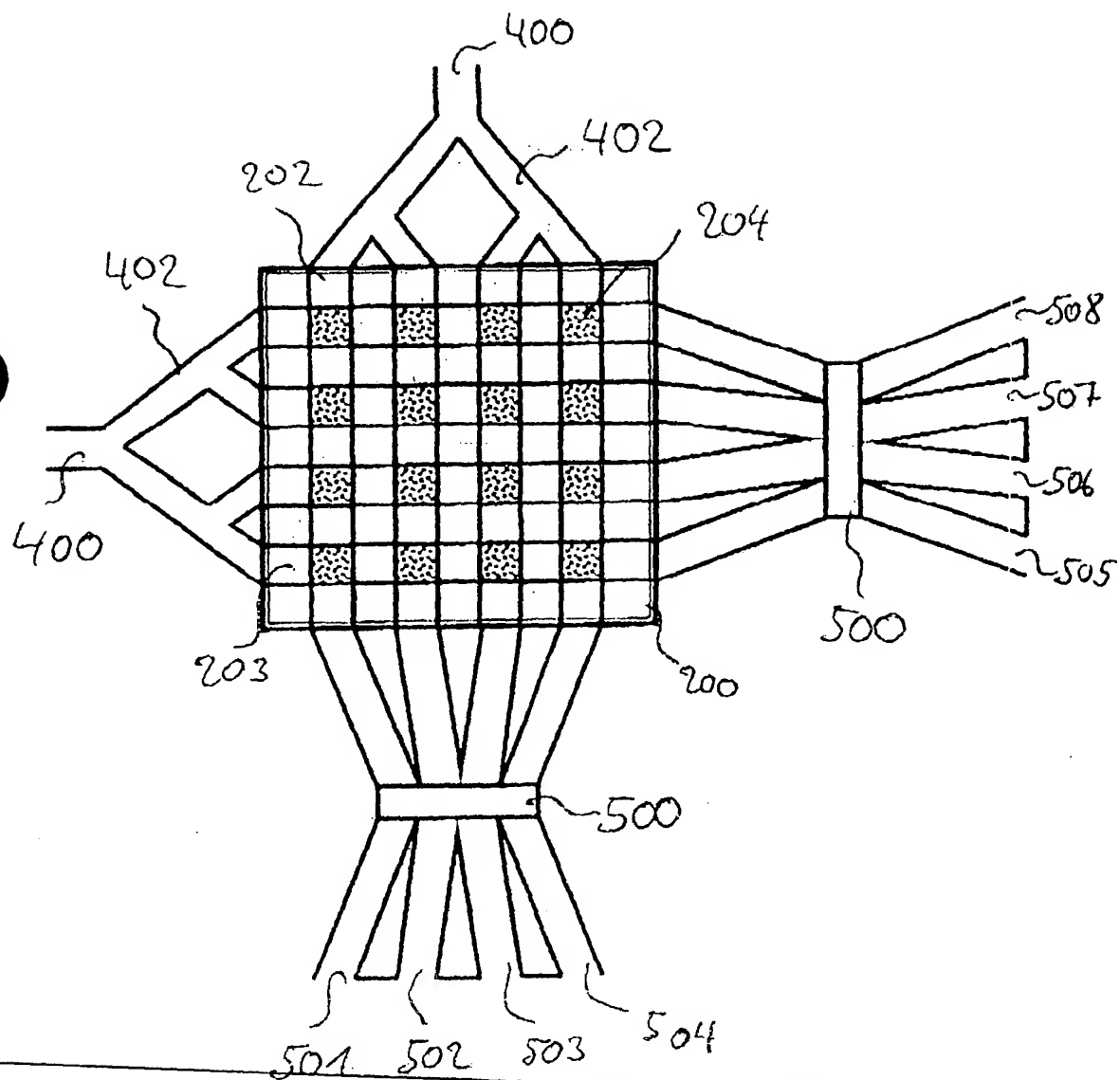


Fig. 14

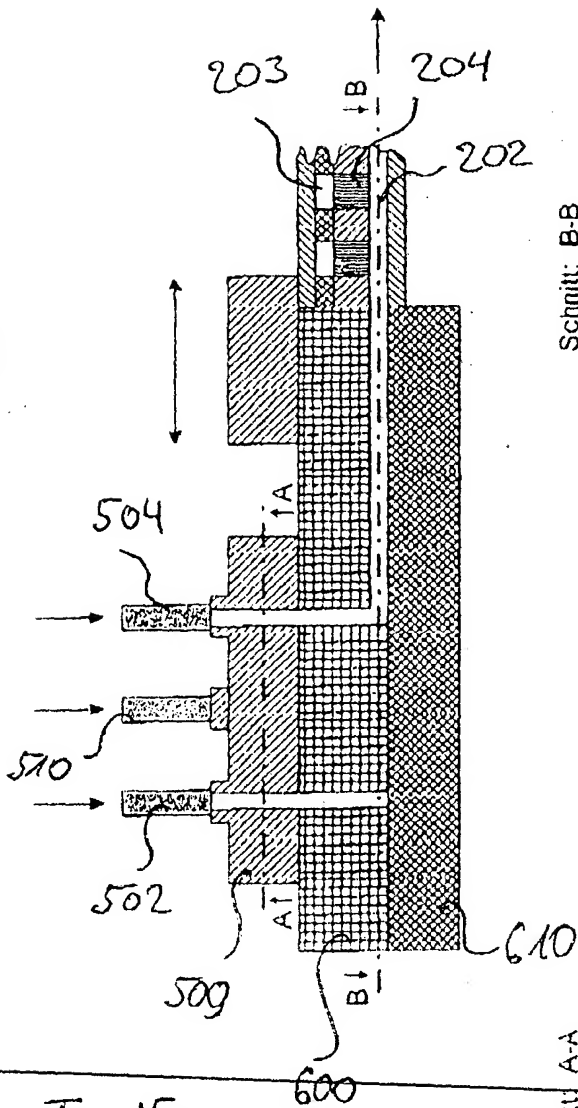


Fig. 15a

Schnitt: B-B

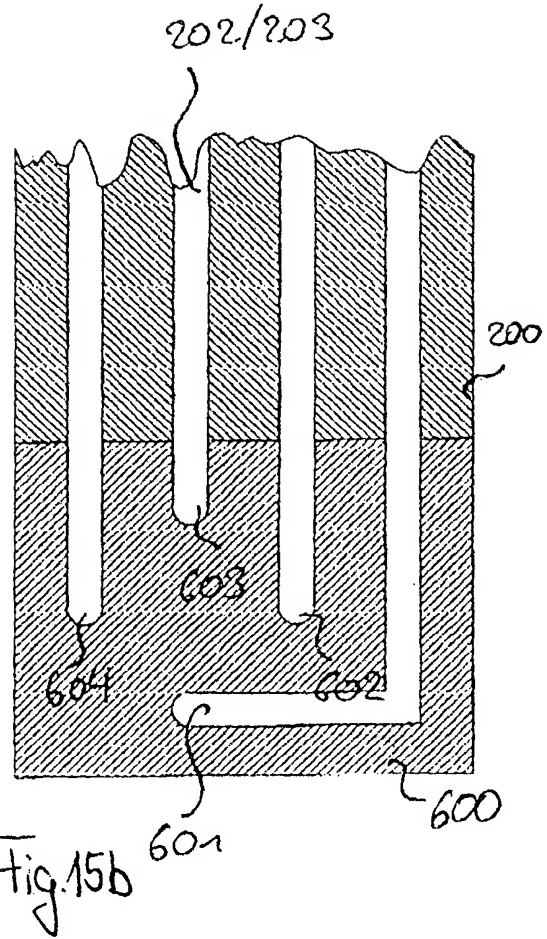


Fig. 15b

Schnitt: A-A

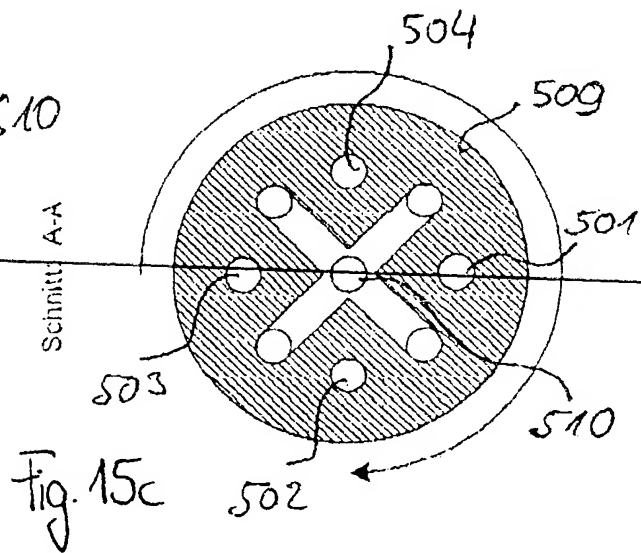
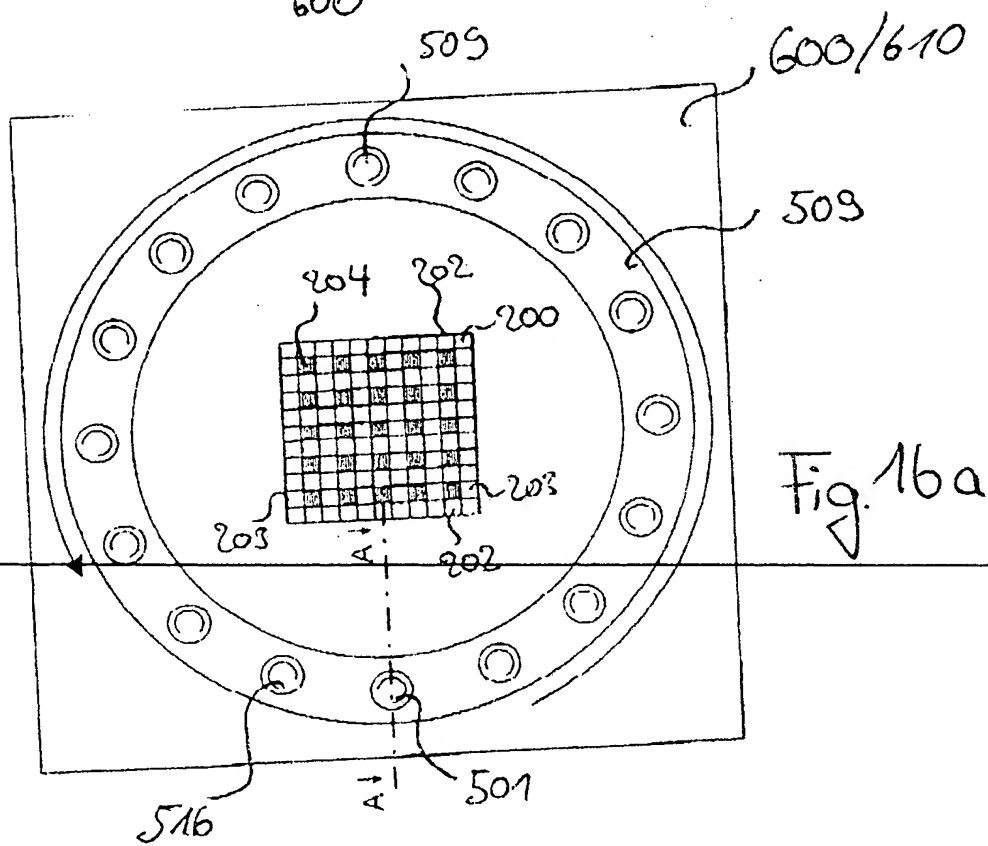
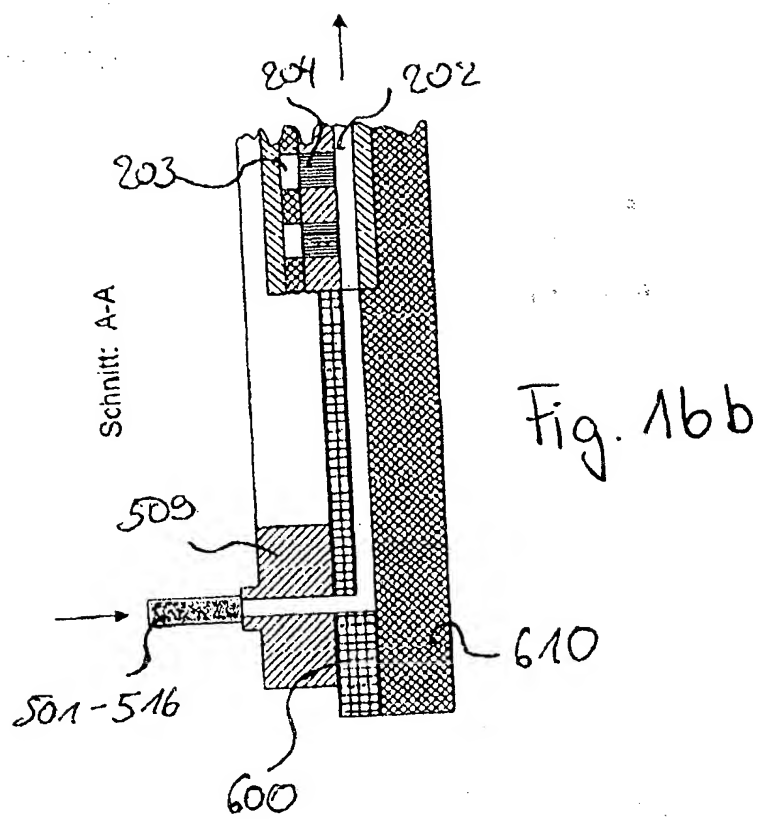


Fig. 15c



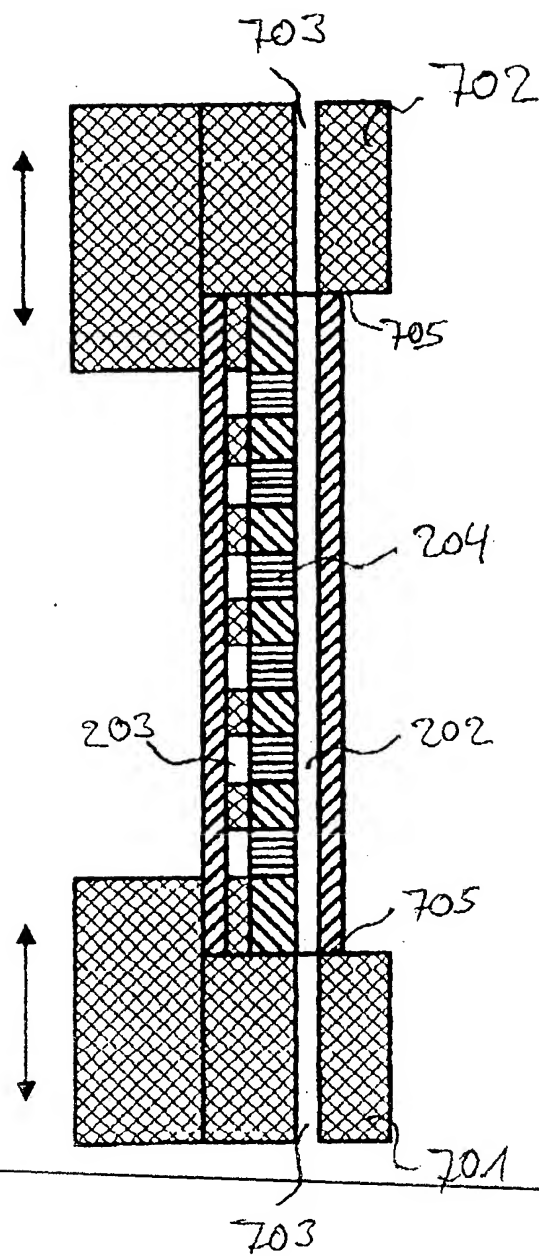


Fig. 17

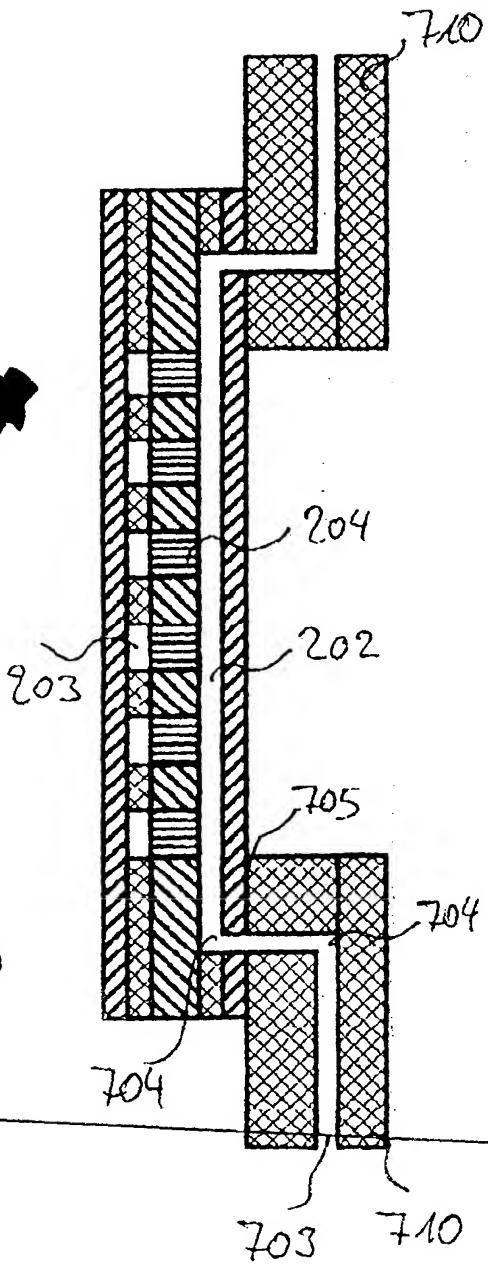


Fig. 18

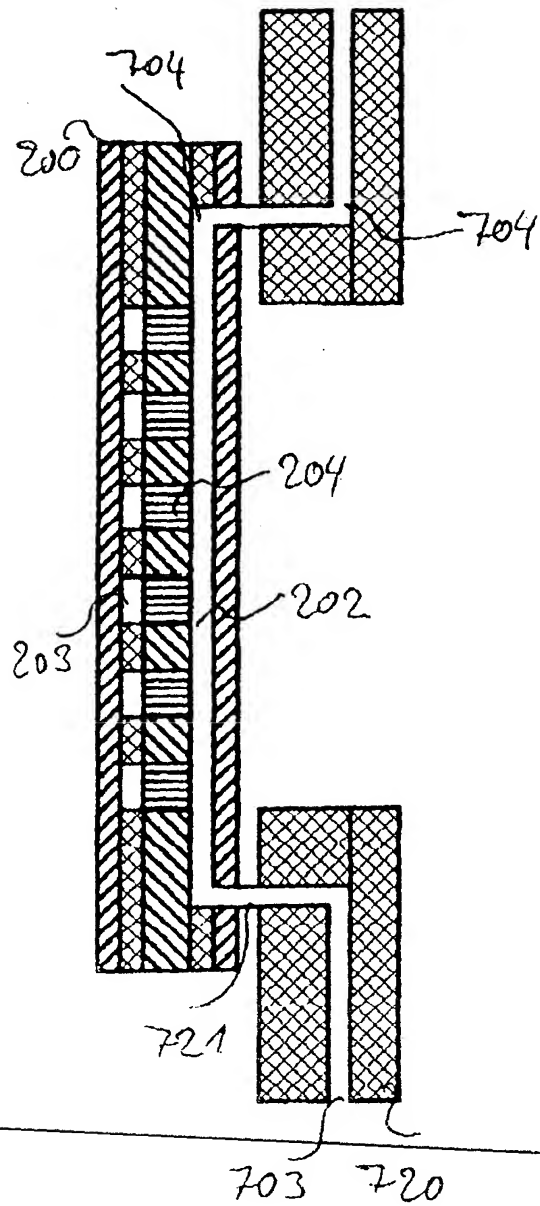


Fig. 19

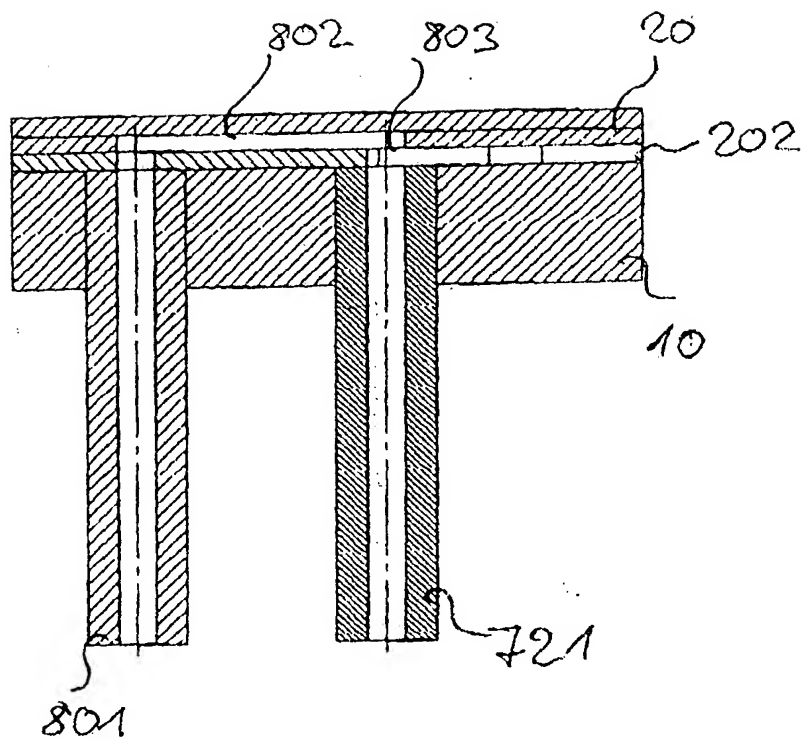


Fig. 20

Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein mikrofluidischer Reaktionsträger, der eine rein fluidische oder auch eine lichtgesteuerte Synthese und Analyse von

5 Oligomeren oder Polymeren ermöglicht.

MIKROFLUIDISCHER REAKTIONSTRÄGER MIT DREI STRÖMUNGSBENEN UND TRANSPARENTER DECKSCHICHT

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein mikrofluidischer Reaktionsträger, der je nach Ausführungsform eine rein fluidische oder auch eine lichtgesteuerte Synthese und Analyse von Oligomeren oder Polymeren ermöglicht. Es ist darüber hinaus
5 prinzipiell jede andere Anwendung als miniaturisierte chemische oder biochemische Synthese- und Analyseplattform beispielsweise zur Anwendung in der Kombinatorischen Chemie denkbar.

Mikrofluidische Systeme stehen allgemein noch am Anfang ihrer Entwicklung. Jedoch
10 stellen sie schon jetzt ein wichtiges Gebiet z.B. im Bereich der Mikropumpen oder Mikroventile dar. Der Schwerpunkt derzeitiger Arbeiten auf diesem Gebiet liegt in der Herstellung miniaturisierter Strukturen bevorzugt unter Einsatz von Verfahren aus der Halbleitertechnik.

Mikrodosiersysteme verknüpfen mikrominiaturisierte Pumpen und Ventile mit Sensoren
15 für Ansteuer- und Regelschaltungen. Solche Systeme werden derzeit für spezielle Anwendungen entwickelt und erprobt, z.B. für die Medikamentendosierung oder die Dosierung von kleinsten Flüssigkeitsmengen im Freistrahlf nach dem Prinzip eines Tintenstrahldruckers. Diese werden beispielsweise für die Herstellung von „Polymersonden-Arrays“ verwendet, indem verschiedene biochemische Substanzen
20 auf definierte Positionen eines Trägerkörpers aufgespritzt werden.

Die Vermischung von Medien in Mikrofluidsystemen, etwa in chemischen Mikroreaktoren oder in Bioreaktoren, aber auch in chemischen Analysesystemen ist bisher noch wenig untersucht. Besteht die Notwendigkeit einer sehr raschen Vermischung, so lassen sich jedoch durch den Einsatz speziell konstruierter
25 Wirbelstrecken, oder durch die Verwendung eines ebenfalls miniaturisierten Mischers sehr hohe Mischungsraten erzielen. Die Entwicklung von Mikromischern hat noch keine Marktreife erreicht und befindet sich größtenteils noch im experimentellen Stadium. Die Interaktion von Fluid und Wand, wie sie für den erfindungsgemäßen mikrofluidischen Reaktionsträger von Bedeutung ist, wurde bisher noch nicht näher
30 untersucht.

Die Realisierung kompletter Mikrofluidanalyse-Systeme wurde bisher nur in einigen Fällen durchgeführt, z.B. in Systemen zur Analyse des Schwermetallgehalts im Grundwasser. Für die Herstellung von Test- und Funktionsmustern solcher Mikrofluidanalyse-Systeme werden bevorzugt verschiedene etablierte Silizium-
5 Technologien, wie zum Beispiel isotropes und anisotropes Ätzen, verwendet.

Ein großer Nachteil der Siliziumtechnik ist der relativ hohe Materialpreis. Deshalb werden aktuell verschiedene kostengünstige Technologien entwickelt, welche die Herstellung von Mikrostrukturen als „Wegwerfartikel“ erlauben. Drei dieser Verfahren sind Mikro-Spritzguß, miniaturisierte Heißprägeverfahren (hot molding) oder die
10 sogenannte LIGA (Lichtinduzierte Galvanoabformung) Technik. Diese Verfahren erlauben im Versuchsstadium die Herstellung von Mikrostrukturen mit Abmessungen kleiner 1 µm.

Heute werden diese Entwicklungen beispielsweise in der DNA-Analytik angewendet. Hierbei ist das aktuelle Forschungsthema eine möglichst schnelle und daher
15 hochparallele Detektion. Die Kombination von Hybridisierung als Nachweisprinzip und optischer Signaldetektion ist am weitesten fortgeschritten. In den USA wird die Entwicklung dieser miniaturisierten Detektions-Chips mit enormem Aufwand vorangetrieben. Die Leistungsfähigkeit in der Analyse liegt hier im Bereich von 10^4 bis maximal 10^5 Basen pro Stunde.

Ziel ist daher die Entwicklung einer Technologie, mit Hilfe deren man im Bereich von 10^8 und mehr Basen pro Stunde analysieren und die ermittelten Daten so aufbereiten kann, daß eine sinnvolle Interaktion zwischen Bediener und dem einzusetzenden Gerät möglich ist. Das Herzstück eines solchen Gerätes ist der Gegenstand dieser Erfindung und soll im folgenden als mikrofluidischer Reaktionsträger beschrieben
25 werden. Dieser erfindungsgemäße Reaktionsträger soll beispielsweise das zentrale Bauteil von Systemen zur automatischen Fragmentsynthese und -analyse von Oligo- bzw. Polymeren darstellen. Ein solches System ist in der Patentanmeldung 19924327.1 beschrieben.

Der erfindungsgemäße Reaktionsträger beinhaltet eine Struktur aus Mikrokanälen unterschiedlicher Größe, Geometrie und Funktion. Ein Teil der Mikrokanäle dient der
30 Fluidzufuhr und -abfuhr. Alle weiteren Kanäle dienen als Reaktionsbereiche, wobei je

nach Anwendung optional auch Fluidreservoirs etc. in die Mikrostruktur integriert werden können. Der Reaktionsträger wird entweder in einer zwei- oder einer dreidimensionalen Struktur durchströmt. Die zweidimensionale Ausführungsvariante besteht aus mindestens jeweils einem Zuführungs- und einem Abführungs kanal in einer Strömungsebene. Diese beiden Kanäle sind durch mehrere etwa senkrecht hierzu verlaufende Kanäle verbunden, wobei diese senkrechten Verbindungs kanäle als bevorzugte Reaktionsbereiche dienen. Die somit entstehenden Reaktionskanäle können ebenfalls wieder in kleinere Kanäle unterteilt sein, wobei jeder Reaktionskanal einen oder mehrere Reaktionsbereiche umfaßt. Diese Reaktionsbereiche können zum Beispiel entlang des Kanals angeordnet sein.

Die komplexere dreidimensionale Ausführungsvariante besteht aus drei Strömungsebenen. Die Zuführungs kanäle sind jeweils zueinander parallel in einer ersten Strömungsebene und die Abführungs kanäle jeweils zueinander parallel in einer dritten Strömungsebene angeordnet, wobei Zuführungs- und Abführungs kanäle in einer senkrechten Projektion entweder parallel zueinander oder unter einem Winkel zueinander angeordnet sind, wobei dieser Winkel vorzugsweise annähernd gleich 90° gewählt wird. An den Kreuzungspunkten der Kanäle in deren senkrechter Projektion in der gewinkelten Anordnung oder entlang der Kanäle in der parallelen Anordnung sind außerdem senkrechte Kanäle angeordnet, die eine dritte Strömungsebene bilden und die Zuführungs kanäle der ersten mit den Abführungs kanälen der dritten Ebene verbinden. Diese Verbindungs kanäle sind wesentlich enger als die Zuführungs- und Abführungs kanäle. Damit wird ein Überströmen der Reaktionsbereiche in den Zuführungs- und Abführungs kanälen ohne Eindringen von Fluid in die Reaktionskanäle ermöglicht. Mehrere Reaktionskanäle zusammen bilden einen Reaktionsbereich.

Damit sind die technischen Voraussetzungen für eine sehr schnelle, effiziente und damit kostengünstige Bereitstellung einer Vielzahl von Reaktionsbereichen geschaffen, zum Beispiel für die integrierte Synthese einer Vielzahl von Polymer sonden und die Analyse einer Vielzahl von Polymerfragmenten mittels dieser Sonden.

In allen Ausführungsvarianten werden die Fluide aus den Reaktionsbereichen abgeführt, ohne daß dabei ein Kontakt dieser Fluide mit einem anderen Reaktionsbereich des gesamten Reaktionsträgers erfolgen würde. Dies ist vor allem

bei Reaktionen relevant, deren Abfallprodukte andere Reaktionsbereiche schädigen oder zerstören könnten.

5 Alle drei Varianten des erfindungsgemäßen mikrofluidischen Reaktionsträgers haben auf der Ober- und der Unterseite jeweils eine Deckschicht. Bei der zweidimensionalen Struktur sowie bei den parallelen Zuführungs- und Abführungskanälen der dreidimensionalen Struktur ist mindestens eine der Deckschichten transparent ausgebildet, um eine lichtgesteuerte Photoaktivierung in den einzelnen Reaktionsbereichen durch individuelle Belichtung z.B. mittels einer programmierbaren
10 Lichtquellenmatrix zu ermöglichen wie sie in der Patentanmeldung 199 07 080.6 beschrieben ist. Alle drei Varianten werden bevorzugt mit zwei transparenten Deckschichten ausgeführt um eine permanente optische Prozesskontrolle im Reaktionsträger sowie die Messung von Nachweisreaktionen im Durchlicht zu ermöglichen.

15 Für lichtabhängige Photoaktivierung sind verschiedene Schutzgruppen bekannt und verfügbar, die zum Teil auch bei der Synthese von Microarrays zur Anwendung kommen. Hierzu zählen als Beispiele MeNPOC, NPPOC und dessen Derivate sowie einige ältere Schutzgruppen, wie sie von Pillai
20 (Synthesis, 1980); Hadrisan und Pillai (Proc. Indian nat. Sci. Acad. 53, 1987) oder Birr et al (Liebigs Ann. Chem. 763, 1972) beschrieben wurden.

Außerdem sind auch Methoden bekannt, bei denen die Photoaktivierung indirekt über die lichtabhängige Aktivierung einer Säure (Photosäure) zu
25 einer anschließenden orts aufgelösten Abspaltung einer säurelabilen Schutzgruppe wie z.B. DMT führt (siehe Gao et al in WO 9941007). Einen ähnlichen Mechanismus kann man sich zunutze machen, wenn man geeignete Photolacke auf den Reaktionsträger aufbringt (siehe McGall in PNAS 93, S. 13555-13560, 1996).

- 5 -

Über diese chemischen Methoden hinaus ist außerdem denkbar, die Synthese durch Photoaktivierung und Photo-Deaktivierung von Enzymen zu steuern.

Die komplexere dreidimensionale Struktur mit den um einen Winkel gedrehten Zuführungs- und Abführungskanälen ermöglicht das individuelle Bespülen jedes einzelnen Reaktionsbereiches aus den senkrecht angeordneten Mikrokanälen. Dies erfolgt indem jeweils ein Zuführungs kanal mit Fluid gespült und an einem Abführungs kanal Fluid abgeführt wird. Das Fluid fließt durch den Zuführungs kanal in die senkrechten Mikroreaktionskanäle und durch den Abführungs kanal wieder aus dem Reaktionsträger hinaus. Genauso können auch mehrere Reaktionsbereiche gleichzeitig und dies sogar mit unterschiedlichen Fluiden gespült werden. Damit erschließt der erfindungsgemäße mikrofluidische Reaktionsträger mit der durch die gewinkelte Anordnung bedingten "Kreuzstruktur" eine Vielfalt an Anwendungen aus der Kombinatorischen Chemie oder der DNA-Analytik.

Eine weitere Anwendung ist das abwechselnde Bestömen zunächst aller Zuführungs- und Abführungs kanäle mit Einsatzstoffen, wobei die Funktion der Fluidzufuhr und -abfuhr der Zuführungs- und Abführungs kanäle von Zyklus zu Zyklus wechselt. Wird beispielsweise jeder Kanal mit einem anderen Baustein einer zu synthetisierenden Polymersonde gespült, so kann durch die Anwendung der Kreuzstruktur in wenigen Zyklen eine große Vielfalt an Oligomer- oder Polymersonden in den einzelnen

Reaktionsbereichen eines Reaktionsträgers erzeugt werden. Die Synthese beliebig spezifischer Einzelsonden in einem Reaktionsbereich ist durch die zuvor beschriebene Einzelansteuerung eines Reaktionsbereiches in Ergänzung problemlos möglich. Damit bietet der erfindungsgemäße mikrofluidische Reaktionsträger mit der Kreuzstruktur die Möglichkeit zur effizienten naßchemischen Oligomersonden- oder Polymersonden-synthese von „Sonden-Arrays“. Diese Vorgehensweise soll im folgenden als fluidisches Multiplexen bezeichnet werden. Auch die In-situ-Synthese mittels Prozessüberwachung sowie die integrierte Synthese- und Analyse sind damit möglich.

Für die rein fluidische Reaktionssteuerung sind keine lichtdurchlässigen Deckschichten notwendig, jedoch ebenfalls sinnvoll für die optische Prozesskontrolle und die Erfassung von Nachweisreaktionen. Die Detektion kann hierbei ebenfalls entweder im Durchlicht oder auch im Rücklicht von einer Seite erfolgen. Kombiniert man die dreidimensionale Kreuzstruktur mit ihren um einen Winkel gedreht angeordneten Zuführungs- und Abführungskanälen mit der lichtgesteuerten Photoaktivierung der Reaktionsbereiche aus Mikrokanälen, so kann man die Effizienz der Synthese von Oligomer- oder Polymersonden noch weiter erhöhen. Sowohl die Lichtquellenmatrix als Lichtquelle als auch der benötigte Detektor können in den mikrofluidischen Reaktionsträger integriert werden. Gleiches gilt für die Integration einer CCD-Matrix als zweite gegenüberliegende Deckschicht. Auch eine direkter Anschluß einer programmierbaren Lichtquellenmatrix als Deckschicht ist möglich. Dies ist insbesondere dann naheliegend, wenn der mikrofluidische Reaktionsträger als festes Bauteil in ein Gerät integriert ist und zwischen den Anwendungen z.B. chemisch gereinigt wird und nur zu Wartungszwecken gewechselt werden muß. Wird der mikrofluidische Reaktionsträger nach jeder Verwendung ausgewechselt, so ist eine direkte Integration jedoch nicht sinnvoll. Vielmehr empfiehlt es sich dann, die Komponenten im System entsprechend anzuordnen.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist die Versorgung des mikrofluidischen Reaktionsträgers mit den entsprechenden Fluiden. Hierzu wurde ein ebenfalls neuartiges, integriertes Ventilsystem konzipiert. Dies erlaubt eine schnelle Bereitstellung einer Vielzahl an Fluiden an den Zuführungs- und Abführungskanälen der Mikrostruktur.

Dieses Fluidversorgungssystem ist für die Anwendung des erfindungsgemäßen mikrofluidischen Reaktionsträgers für den Aufbau von Oligomer- oder Polymersondenarrays in den Reaktionsbereichen konzipiert. Das Versorgungssystem gleicht sich in den Anschlüssen und Komponenten für die „oberen“ und die „unteren“ Zuführungs- und Abführungskanäle. Von der einen Seite her werden alle Kanäle individuell über ein im folgenden beschriebenes Multiplexventil versorgt. Am jeweils dazugehörigen anderen Kanalende werden alle Kanäle zusammengeführt, wobei diese Zusammenführung für die Zu- und Abführung bei einheitlicher Bespülung aller Reaktionsbereiche verwendet wird. Bei der Synthese von Oligomer- oder Polymersonden in den Reaktionsbereichen sind dies alle Zyklen außer der Zuführung der spezifischen einzelnen Bausteine, beispielsweise bestehend aus einem oder mehreren Nukleotiden im Fall der DNA-Synthese. Will man alle Reaktionsbereiche erreichen und nicht spezifisch auswählen, so ist es besser, eine strömungsoptimierte Zuführung wie beispielsweise eine duale Verästelung zu wählen, als über das Multiplexventil mit dem höheren Verschleppungsrisiko. Für das Zuführen der spezifischen Bausteine benötigt man jedoch das Ventil. Dieses verbindet die Mikrokanäle des Reaktionsträgers auf der einen Seite mit einer maximal gleich großen Anzahl an individuellen Tanks sowie einem Sammelanschluß auf der anderen Seite. In einer Position des Ventils wird jeweils ein Tank mit einem oder mehreren Kanälen des Reaktionsträgers verbunden. Soll das Fluid eines Tanks in einem Zyklus in mehr als einen Kanal bzw. ein Kanalbündel des Reaktionsträgers gelangen, so wird erst ein Kanal und anschließend weitere Kanäle seriell versorgt. Der Sammelanschluß entspricht der Zusammenführung der Kanäle auf der jeweils gegenüberliegenden Seite des Reaktionsträgers. Er dient der effizienten Spülung von Ventil und Reaktionsträger.

Die Anschlüsse des mikrofluidischen Reaktionsträgers an seine Fluidversorgung und Fluidentsorgung ist ein wichtiges Element. Wird der Reaktionsträger in der spezifischen Anwendung immer wieder gereinigt und wiederverwendet, so kann eine aufwendiger Anschlußtechnik, beispielsweise an das Multiplexventil vorgesehen werden. Hierbei ist, insbesondere bei einer großen Anzahl von Kanälen, eine Ausführung analog der Halbleiterprozessortechnik mit einer Vielzahl an kleinsten Kanälen in sogenannten "Beinen" möglich. Diese Ausführung hat strömungstechnisch den Nachteil der Gefahr von Ablagerungen in den Biegungen und Knicken der

einzelnen Mikrokanäle. Hier kann eine Hinterspülung wie zur Vermeidung von Verschleppungen vorgesehen werden. Bei der Anwendungsvariante, in welcher der Reaktionsträger nach jeder Anwendung ausgewechselt wird, sind schnelle und ohne Klebung dichtende Anschlüsse notwendig. Dabei kann zum Beispiel flächig an der Stirnseite des Reaktionsträgers mit durchgehendem biegungsfreiem Kanalverlauf angeschlossen werden. Somit ist das Verschleppungsrisiko minimal. Eine zweite Alternative ist das Aufpressen der Unterseite des Reaktionsträgers auf die Fluidzuführung. Geeignete chemikalienbeständige Dichtungen sind dabei jeweils vorzusehen.

Unter einem Aspekt der Erfindung soll unter einer Reinigung insbesondere eine vollständige Regenerierung des Reaktionsträgers verstanden werden. Im regenerierten Zustand kann dieser dann wieder zu einer neuen Polymer-synthese benutzt werden. Bei der chemischen Reinigung ist vorzugsweise zu beachten, dass die für die Anbindung eines ersten Polymerbausteins notwendige Anknüpfungsstelle nicht zerstört wird. Die für die chemische Reinigung notwendige Sollbruchstelle kann durch chemische (z.B. nass-chemische, photochemische, elektrochemische) oder durch eine biologische (z.B. enzymatische) Transformation gespalten werden. Dies kann durch einen ein- oder mehrstufigen Prozess erfolgen. Vorzugsweise wird die Sollbruchstelle bei der ersten Oberflächenderivatisierung des mikrofluidischen Reaktionsträgers - vorzugsweise im Linkersystem, das die Oberfläche mit dem ersten Polymerbaustein verbindet - bereitgestellt. Es ist jeweils sichergestellt, dass die Sollbruchstelle weder während der Synthese noch während der Analyse durch die verwendeten Analyten oder Reagenzien gebrochen werden kann.

Einstufiger Prozess:

Die Sollbruchstelle wird durch eine einzige Transformation gebrochen. Beispiele hierfür sind basenlabile Linker, säurelabile Linker, oxidationslabile Linker oder der Abbau mit Hilfe von geeigneten Enzymen.

5

Neben einer chemischen Reinigung kann damit auch eine enzymatische Reinigung des Reaktionsträgers durchgeführt werden. Hierbei werden die mit dem Reaktionsträger verknüpften Polymer- bzw. Oligomersonden mit einem DNA- bzw. RNA-abbauenden Enzym oder einem Peptid-spaltenden Enzym gespalten bzw. "verdaut", wodurch es zu einem teilweisen oder
10 vollständigen Abbau der Sonden kommt. Im Anschluss kann der Reaktionsträger erneut zur Synthese neuer Sonden verwendet werden.

Als Enzyme kommen Nucleasen wie Exonucleasen oder Endonucleasen in Frage, die einen Nucleinsäurestrang von den Enden bzw. innerhalb des
15 Sondenstrangs angreifen und Nucleotide bzw. Nucleoside als Spaltprodukte hinterlassen. Im Falle von RNA ist die Verwendung von RNAsen (wie RNase H usw.) möglich, die bei Ausbildung eines RNA-DNA-Doppelstrangs selektiv den RNA-Teil zerschneiden, wodurch bei RNA-Sonden die gesamte Sonde
20 und bei RNA-Teilabschnitten als Sollbruchstelle der RNA-Abschnitt gespalten wird. Die Regeneration eines Reaktionsträgers mit DNA-Sonden kann ebenfalls durch Einsatz von DNAsen (DNase I, DNase II, etc.) erreicht werden, wodurch sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige DNA abgebaut werden kann.

25

Ebenfalls können Peptid-spaltende Enzyme für den Abbau von Peptidsonden bzw. Peptid-Sequenzabschnitten als Sollbruchstelle eingesetzt werden.

Mehrstufiger Prozess:

30

Die Sollbruchstelle wird in einem mehrstufigen Prozess gebrochen, d.h. die Sollbruchstelle ist in einer Form maskiert. Hierzu ist notwendig, dass diese Maskierung in einem oder mehreren Schritten zunächst entfernt wird, bevor

im darauffolgenden Schritt die Sollbruchstelle dann letztendlich gebrochen werden kann.

Als ein Beispiel kann ein maskierter photolabiler Linker verwendet werden, in dem durch eine vorgeschaltete Transformation eine für die Photolabilität notwendige o-Nitrofunktion erst generiert wird. Das kann z.B. durch Oxidation einer Aminofunktion erfolgen. Dieser - nicht notwendigerweise spezifische - Oxidationsschritt kann enzymatisch oder nasschemisch erfolgen. Ist die o-Nitrofunktion erzeugt, kann dann die Spaltung der Sollbruchstelle durch Lichteinstrahlung erfolgen.

Als eine weitere Lösung kann in einem ersten Schritt eine doppelsträngige DNA-Sequenz durch Zugabe eines zum Linker komplementären Analyten erzeugt werden, die dann im folgenden Schritt durch ein spezielles Enzym (Restriktionsenzym) erkannt und spezifisch abgespalten wird.

Bei Verwendung eines RNA-Teilabschnitts als Sonden-"Sockel" kann eine chemische Regeneration des Reaktionsträgers ebenfalls in mehreren Stufen erfolgen. Dabei wird zunächst die Synthese unter Verwendung von 2'-OH-geschützten Phosphitamidbausteinen durchgeführt. Nach Hybridisierung und Analyse wird für die Regeneration die Schutzgruppe des RNA-Teilabschnitts abgespalten, woraus eine freie 2'-OH-Gruppe resultiert. Daraufhin kann in einem folgenden chemischen Reaktionsschritt mit Hilfe von Perjodat oder anderen Oxidationsmitteln der Ribosezucker gespalten und die Sonde durch β -Eliminierung vom Reaktionsträger entfernt werden.

Den vorstehend beschriebenen Prozessen der Reinigung (Rezeptorabspaltung) kommt im Rahmen der Erfindung selbständige Bedeutung unabhängig von einer speziellen Träger-Ausgestaltung zu. Der Anmelder behält sich vor, ggf. selbständige Patentansprüche zu der beschriebenen Technologie der Reinigung bzw. Rezeptorabspaltung aufzustellen.

Es sei darauf hingewiesen, dass die Rezeptorabspaltung bzw. Molekül-
abspaltung im vorstehend erläuterten Sinne auch dazu durchgeführt werden
kann, abgespaltene Moleküle zu sammeln und für weitere chemische
Prozesse, z.B. für einen Syntheseschritt, einzusetzen. In diesem Sinne
können die Reinigungsprozesse als Schritte zur Gewinnung von auf einem
Träger synthetisierten Molekülen betrachtet werden.

Der Aufbau des erfindungsgemäßen mikrofluidische Reaktionsträger erfolgt wie dies
auch in der Halbleiter-Mikrotechnik üblich ist in mehreren Schichten. Hierbei kann
zwischen einer Einteilung der Mikrostruktur in funktionale Schichten und
konstruktionsbedingte Schichten unterschieden werden.

Während es in einer zweidimensionalen Struktur mindestens drei funktionale
Schichten gibt, besteht eine dreidimensionale Struktur aus mindestens fünf
funktionalen Schichten. Diese funktionalen Schichten sind nachfolgend näher
beschrieben. In der Produktion lassen sich oft mehrere dieser funktionalen Schichten
mittels geeigneter Herstellungsverfahren in eine konstruktionsbedingte Schicht
integrieren.

Die funktionalen Schichten der zweidimensionalen Struktur enthalten eine mittlere
Strukturschicht, in welche die Mikroströmungsstruktur aus Kanälen,
Reaktionsbereichen und Reservoirs eingebracht ist. Sie wird mit einer oberen und
einer unteren Deckschicht verbunden und kann aus Glas, Kunststoff oder Silizium
beschaffen sein. Je nach Ausführung kann das verwendete Material transparent oder
auch lichtundurchlässig sein. Beispielsweise empfiehlt sich als lichtundurchlässiges
Material Futoran-Glas der Firma Schott, Silizium oder Teflon.

Die dreidimensionalen Strukturen bestehen aus fünf Funktionalen Schichten. Einer
ersten, „oberen“ Deckschicht, einer darunterliegenden Struktur aus Mikrokanälen für
die Fluidzuführung und Abführung in zur zweidimensionalen Struktur analogen Weise,
einer mittleren Ebene aus senkrechten, (bevorzugt um mindestens den Faktor 10)
kleineren Mikrokanälen, welche als Reaktionsbereiche dienen. Auf der „Unterseite“

schließen sich wieder eine Ebene für Fluidversorgung und eine Deckschicht an, die beide analog zur „Oberseite“ ausgebildet sind. Insgesamt ist der Reaktionsträger spiegelbildlich zu einer mittleren Ebene aufgebaut. Die Herstellung muß sich nicht unbedingt nach den funktionalen Schichten richten. So ist eine Integration der Zuführungs- und Abführungsstruktur sowohl in der mittleren Schicht als auch in der Deckschicht möglich. Für die mittlere Schicht mit den senkrechten Mikrokanälen als Reaktionsbereiche können beispielsweise geeignete Silizium-Wafer aus der Halbleitertechnik mit geätzten „Poren“ der Firma Siemens oder zusammengeschmolzene Glasfasern (Fiberglas-Wafern) der Firma Schott mit herausgeätzten Seelen und einem Größenverhältnis zwischen Wandstärke und Kanalquerschnitt von vorzugsweise 1 zu 5 verwendet werden. Um die exakte Bespülung nur der „angesteuerten“ Reaktionskanäle zu verbessern, kann die mittlere funktionale Ebene durch eine obere und eine untere Zwischenschicht ergänzt werden. Diese verhindert bzw. erschwert ein ungewolltes Einströmen von Fluiden (hydrophile bzw. hydrophobe Barrieren).

Die notwendigen Herstellungsverfahren unterscheiden sich je nach dem verwendeten Material. Bei Silizium-, Glas- und Fiberglaswafern (mit und ohne Seele) kommen als Verbindungstechniken Bonding-Verfahren zum Einsatz. Die Teile, wie zum Beispiel die verschiedenen Wafer, werden durch Ätztechniken sowie Sägen und Polieren hergestellt. Für die Verwendung von Kunststoffen wie Teflon, welches lichtundurchlässig ist, und COC oder Polystyrol, welches transparent ist, kommen Verfahren wie Spritzguss, Heißprägen oder LIGA zum Einsatz. Die Verbindung von Bauteilen erfolgt z.B. mittels Kleben oder Ultraschallschweißen oder durch mechanische Druckdichtung mittels einer Halterung oder eines Rahmens.

Die obere Deckschicht schließt die darunterliegende Mikroströmungsstruktur nach außen ab. Hierdurch entstehen die Mikrokanäle. Für den Eintrag von Licht in diese Kanäle ist die Schicht lichtdurchlässig ausgebildet. Für eine optimierte Optik können auch Mikrolinsen in Glas der Firma Mikrogas oder Kunststoff (IMM Mainz) verwendet werden. Möglich ist ebenfalls der Einsatz einer Wabenstruktur aus zusammengeschmolzenen Glasfasern, die z.B. von der Firma Schott oder ITT entwickelt wurde und beispielsweise bei Nachtsichtgeräten zum Einsatz kommt. Hierzu werden lange Glasfaserbündel so erhitzt, daß sie zusammenschmelzen und eine Einheit bilden. Auf diese Weise entsteht eine „Stange“, von welcher dann in zur Siliziumtechnologie analogen Weise dünne Scheiben abgesägt und poliert werden.

Diese können anschließend mit Glas oder Silizium gebondet oder mit Kunststoffen verklebt bzw. verschweißt werden.

Der erfindungsgemäße mikrofluidische Reaktionsträger wird in seiner bestimmungsgemäßen Verwendung folgendermaßen eingesetzt: Zunächst wird eine Gruppe von Reaktionsbereichen durch die Mikrokanäle einer zwei- bzw. dreidimensionalen Mikrostruktur angesteuert. Nach der dort erfolgten Reaktion werden die in den einzelnen Reaktionsbereichen entstehenden Reaktionsprodukte durch Mikrokanäle abgeführt, ohne daß dabei die Reaktionsprodukte einen weiteren Reaktionsbereich durchströmen. Dabei kann eine Ansteuerung der Reaktionsbereiche in der beschriebenen dreidimensionalen Kreuzstruktur zur rein fluidischen Synthese von Oligo- oder Polymeren aus Mono-, Oligo- oder Polymeren, oder auch zur Beschleunigung der lichtgesteuerten Synthese oder einer kombinierten nasschemischen und lichtgesteuerten Synthese von Oligomeren oder Polymeren durch das beschriebene intelligente Multiplexen der Einsatzstoffe genutzt werden.

Währenddessen erfolgt eine optische Kontrolle aller Reaktionsbereiche und Mikrokanäle durch transparente Deckschichten als Plattform für eine In-Situ-Synthese, eine permanente Prozesskontrolle und Regelung der Abläufe in der Mikrostruktur. Damit ist die Basis für eine umfassende Qualitätssicherung geschaffen. Lichtsignale von Nachweisreaktionen, welche in den Reaktionsbereichen durch chemische (z.B. Lumineszenz), biochemische (z.B. Biolumineszenz) oder lichtinduzierte (z.B. Fluoreszenz) Reaktionen entstehen, können in einem den fluidischen Mikroprozessor umgebenden integrierten Synthese- und Analyse-Gerät, wie es in der Patentanmeldung 19924327.1 beschrieben ist, erfaßt werden. Weiterhin möglich sind Absorptionsmessungen im Reaktionsträger durch die Erfassung von Lichtsignalen, welche die Mikrokanäle und Reaktionsbereiche im Durchlichtverfahren durchqueren oder im Rücklichtverfahren reflektiert werden. Dies kann zum Beispiel für eine erweiterte qualitative Qualitätssicherung genutzt werden.

Die Vorteile dieses erfindungsgemäßen mikrofluidischen Reaktionsträgers sind vielfältig: Zum einen werden die Reaktionsprodukte von jedem Reaktionsbereich abgeführt, ohne daß ein weiterer Reaktionsbereich mit den Reaktionsprodukten in Berührung kommt. Dies ermöglicht die Durchführung von Reaktionen für die Synthese

und Analyse in den Reaktionsbereichen, welche Reaktionsprodukte (Endprodukte oder Zwischenprodukte) erzeugen, die für andere Reaktionsbereiche schädlich wären.

Im Vergleich zu planaren Flächen haben die dreidimensionalen Mikrokanäle eine größere als Festphase nutzbare Oberfläche.

- 5 Die Verwendung von Mikrostrukturen reduziert die für die Reaktionen benötigte Fluidmenge und erhöht gleichzeitig die Reaktionsgeschwindigkeit. Dies gilt sowohl für kovalente Bindungen wie auch zum Beispiel für die Hybridisierungszeiten bei Anwendungen in der DNA, RNA, PNA, LNA- Analytik oder bei Proteinanwendungen.

- 10 Durch transparente Deckschichten werden Photoreaktionen zum Beispiel für die lichtgesteuerte Synthese von DNA, RNA, PNA, LNA oder Proteinen, etc. ermöglicht.

- Außerdem wird durch die transparenten Deckschichten eine permanente Prozesskontrolle für die Regelung der Reaktionen sowie der Fluidik im Reaktionsträger ermöglicht. Dadurch werden die Fehler sowohl bei der Produktion als auch bei der Detektion deutlich reduziert, womit sich die Zahl der auswertbaren Messungen pro
- 15 Material- und Zeiteinsatz erhöht.

Durch eine geeignete Auslegung der Geometrie der einzelnen Reaktionsbereiche sowie der Mikrokanäle zwischen den Reaktionsbereichen lassen sich die Strahlengänge unter Berücksichtigung der auftretenden Brechungsindizes im Reaktionsträger gezielt beeinflussen.

- 20 Die erfindungsgemäßen fluidischen Mikroprozessoren können als einfache Komponenten für den einmaligen Gebrauch ausgeführt werden. Prinzipiell sind hier kostengünstige Kunststoff- Strukturen zu bevorzugen, aber auch Glas- und Silizium oder auch Materialkombinationen sind als Ausführungen möglich. Die schnelle und kostengünstige Produktion wird eine Vielfalt von individuellen Anwendungen
- 25 ermöglichen, bei denen z.B. unter Berücksichtigung von Sequenz- und Gendatenbanken im Internet gezielt Sonden-Arrays synthetisiert und analysiert werden können.

- Dabei finden die Reaktionen immer an den Wänden der Mikroreaktionskanäle statt. Folglich sind die Reaktionsbereiche immer dreidimensional ausgeprägt und haben eine
- 30 erheblich größere Oberfläche als die planare Grundfläche. Durch diese

dreidimensionale Geometrie ist also die nutzbare Reaktionsoberfläche stark vergrößert. Diese Größe der Oberfläche ist für die Verwendung als feste Phase von großer Bedeutung. Sie kann zum Beispiel für die Anlagerung von Oligonukleotiden bei der Synthese im Reaktionsträger ebenso von Bedeutung sein wie für die Anlagerung von vorbeiströmenden Proben-Fragmente bei einer Analyse im Reaktionsträger.

Die dreidimensionale Kreuz- Struktur ermöglicht Anwendungen zum Beispiel in der Oligonukleotid- Analytik oder in der Kombinatorischen Chemie etc. Durch die Verwendung der beiden sich überkreuzenden Strukturen läßt sich schnell eine Vielzahl an unterschiedlichen Kombinationen von Oligomeren oder Polymeren in den individuellen Reaktionsbereichen des Reaktionsträgers erzeugen. Dadurch ist eine sehr effiziente naßchemische Synthese eines Oligomer- oder Polymersondenarrays in einem Reaktionsträger möglich. Dies kann computergesteuert erfolgen, wodurch die Erzeugung von beliebigen Nukleotidkombinationen in jedem Reaktionsbereich ermöglicht wird. Die Analyse kann ebenfalls direkt im Reaktionsträger erfolgen, wobei eine permanente Prozeßkontrolle möglich ist.

Durch ein entsprechendes Multiplexen der Fluide kann die Zahl der Herstellungszyklen von „Sondenarrays“ reduziert werden. Für die ortsspezifische Erzeugung einer Vielzahl unterschiedlicher Oligo- oder Polymersonden von beispielsweise 20 Basen Länge auf einer planaren Oberfläche mittels örtlicher Photoaktivierung benötigt man in jeder Ebene vier Syntheseyklen, was durch die vier verschiedenen Basen bedingt ist. Insgesamt werden also $4 \times 20 = 80$ Zyklen benötigt. Dabei besteht keine systematische Möglichkeit die Anzahl an Syntheseyklen zu reduzieren. Bei der Synthese im mikrofluidischen Reaktionsträger bietet sich hingegen die Möglichkeit, die Einsatzstoffe, also die Mono- oder Oligomere, gleichzeitig auf mikrofluidische Subbereiche zu verteilen. Dadurch lassen sich die Syntheseyklen bei Verwendung von Tetrameren beispielsweise auf minimal 5 Zyklen reduzieren. Die genaue Anzahl der für einen spezifischen Sondenarray benötigten Zyklen ist für jedes Sondenmuster individuell und kann nur als statistischer Mittelwert angegeben werden, wenn die Anzahl an Reaktionsbereichen im Reaktionsträger, die Anzahl an parallelen fluidischen Subräumen und die Länge der zu synthetisierenden Oligomere vorgegeben ist.

- Folgende Verfahren werden mit dem erfindungsgemäßen Reaktionsträger anwendbar:
Neben der Synthese von Oligomeren und Polymeren bis zu ganzen Genen und Genomen bietet sich die Möglichkeit des "de novo"- Sequenzierens von nicht bekannten Polymeren wie DNA, RNA, PNA, LNA, Proteinen und anderen durch einen
5 Sequenzvergleich mit aufbereitetem Probenmaterial. Darüber hinaus möglich ist das „Re“- Sequenzieren von Polymeren, also der Vergleich von bekannten mit unbekannten Sequenzen, wobei die bekannten Sequenzen gezielt ausgewählt werden. Ebenfalls möglich ist die Herstellung von Substanzbibliotheken für Screening- und Analyseverfahren, insbesondere zur Nukleinsäure-Analyse über Hybridisierung.
- 10 In dem erfindungsgemäßen mikrofluidischen Reaktionsträger lassen sich alle Vorgänge von der Synthese bis zur Analyse einfacher oder komplexer Moleküle integrieren und diese sehr effizient durchführen. Dies ermöglicht zum Beispiel die flexible und kostensparende Analyse einer großen Zahl von Polymeren durch Bereitstellen einer Vielzahl von individuellen und spezifischen Polymersonden in
15 miniaturisiertem Format mit anschließendem Vergleich der Sonden mit Analyten des Probenmaterials. Dadurch kann in Screening- und Analyseverfahren eine große Menge an Meßdaten erzeugt werden und somit die Informationsfülle biologischer Systeme effizient in kürzester Zeit ganzheitlich bewältigt werden.
- Anwendungsfelder sind außerdem Verfahren und Geräte zur kontinuierlichen,
20 diskreten Fragmentanalyse, welche durch die vorliegende Erfindung beschleunigt und damit effizient einsetzbar gemacht werden, sowie prinzipiell alle Anwendungen der Oligo/Polymeranalyse wie bei Liquid Chromatographie/High Pressure Liquid Chromatographie, Gaschromatographie, Dünnschichtchromatographie, Gelelektrophorese, Kapillarelektrophorese, Massenspektrometrie etc. sowie alle
25 Anwendungen von „Sonden Arrays“. Weiterhin unterstützt wird damit die Substanzentwicklung und das Austesten von entsprechenden Substanzen u.a. in der Pharmaforschung. Weitere wichtige Anwendungsgebiete sind die Molekulare Diagnostik, DNA- und/oder RNA-Analyse, Screening nach molekularen Interaktionen beispielsweise in der Immunologie, Molekularbiologie, Histologie und
30 Kombinatorischen Chemie.

Bei der Gestaltung gibt es ebenso wie bei der Fertigung der Reaktionsträger eine Vielzahl von Ausführungsvarianten, die in den folgenden Skizzen dargestellt sind:

Fig.1a zeigt eine zweidimensionale Struktur des mikrofluidischen Reaktionsträgers in der Draufsicht. Fig. 1b und 1c zeigen die dazugehörigen Schnittdarstellungen:

Die Mikrokanalstruktur 1 befindet sich in der mittleren Strömungsebene 30 des Reaktionsträgers. Diese mittlere Strömungsebene wird von der unteren Deckschicht 10 und der oberen Deckschicht 20 abgeschlossen. Die Strömungsstruktur besteht aus Zuführungskanälen 2 und Abführungskanälen 3, sowie den dazwischenliegenden Reaktionskanälen 4 mit jeweils mindestens einem Reaktionsbereich.

Fig.2 zeigt eine dreidimensionale Struktur des mikrofluidischen Reaktionsträgers in der Draufsicht. Fig. 2b, 2c und 2d zeigen die dazugehörigen Schnittdarstellungen: Die Mikrokanalstruktur 100 besteht aus der unteren Fluidzuführungsstruktur 32 mit den Mikrokanälen 102 und der oberen Abführungskanalstruktur 31 mit den Mikrokanälen 103. Dazwischen befinden sich in der mittleren Schicht 40 die annähernd senkrecht zur Zuführung und Abführung angeordneten Verbindungs- bzw. Reaktionskanäle in den Reaktionsbereichen 104. Die Deckschichten 20 und 30 sind wahlweise transparent oder lichtundurchlässig.

Fig. 3a, 3b und 3c zeigen nochmals die Darstellungen der Fig. 2a, 2b und 2c. Dabei verdeutlichen die Schnittdarstellungen den Strömungsverlauf durch die Zuführungskanäle 102, die Reaktionskanäle 101 in den Reaktionsbereichen 104 und die Fluidabführung 103.

Fig.4a zeigt eine dreidimensionale Kreuzstruktur des mikrofluidischen Reaktionsträgers in der Draufsicht. Fig. 4b, 4c, 4d und 4e zeigen die dazugehörigen Schnittdarstellungen: Die Mikrokanalstruktur 200 befindet sich in der unteren Fluidzuführungs- und Fluidabführungsstruktur 32 mit den Mikrokanälen 202 und der oberen Fluidzuführungs- und Fluidabführungsstruktur 31 mit den Mikrokanälen 203, jeweils um 90° zueinander gedreht. Dazwischen befinden sich in der mittleren Schicht 40 die senkrecht zur Zuführung und Abführung angeordneten Verbindungs- bzw.

Reaktionskanäle in den Reaktionsbereichen 204. Die Deckschichten 20 und 30 sind wahlweise transparent oder lichtundurchlässig.

Fig. 5a, 5b und 5c zeigen nochmals die Darstellungen der Fig. 4a, 4b und 4c. Dabei verdeutlichen die Schnittdarstellungen der Mikrostruktur 200 den Strömungsverlauf durch die Zuführungs- und Abführungskanäle 202 und 203, sowie die Reaktionskanäle 201 in den Reaktionsbereichen 204.

Fig. 6 zeigt die Darstellung einer einzelnen zweidimensionalen Strömungsstruktur analog Fig. 1 mit veränderten Querschnitten der Zuführungskanäle 2 und der Abführungskanäle 3 zur gezielten Strömungsbeeinflussung. Die Reaktionskanäle 4 mit jeweils mindestens einem Reaktionsbereich sind hier im Querschnitt unverändert, können aber auch modifiziert werden.

Fig. 7a zeigt analog zu Fig. 6 eine einzelne zweidimensionale Strömungsstruktur mit in der Höhe der Kanäle veränderten Querschnitten der Zuführungskanäle 2 und der Abführungskanäle 3 zur gezielten Strömungsbeeinflussung. Die Reaktionskanäle 4 mit jeweils mindestens einem Reaktionsbereich sind hier im Querschnitt ebenfalls verändert und nicht einheitlich in der Größe. Die Struktur wird durch die schräg angeordneten Deckschichten 10 und 20 geschlossen.

Fig. 8 zeigt die Darstellung einer dreidimensionalen Strömungsstruktur analog Fig. 2 und 3 mit veränderten Querschnitten der Zuführungskanäle 102 und der Abführungskanäle 103 zur gezielten Strömungsbeeinflussung. Die Reaktionskanäle in den Reaktionsbereichen 104 sind dabei in ihrer Größe unverändert.

Fig. 9 zeigt eine zu Fig. 8 analoge Darstellung, wobei die Reaktionsbereiche 104 entsprechender der Größe der Zuführungskanäle 102 und Abführungskanäle 103 unterschiedliche Größe aufweisen.

Fig. 10a, 10b und 10c zeigen eine zu Fig. 3a, 3b und 3c analoge Darstellung, wobei sich die Zuführungskanäle 102 und die Abführungskanäle 103 in ihrer Höhe verändern und damit die Strömung beeinflussen. Die Reaktionsbereiche 104 und die Reaktionskanäle 101 sind, bedingt durch die Dicke der mittleren Strukturschicht 40, einheitlich lang.

Fig.11a, 11b, 11c, 11d und 11e zeigen eine dreidimensionalen Kreuzstruktur der Strömung in einer zu Fig. 4a, 4b, 4c, 4d und 4e und 5a, 5b und 5c analogen Darstellung mit veränderten Querschnitten der Zuführungskanäle 202 und Abführungskanäle 203 zur gezielten Strömungsbeeinflussung. Die Reaktionskanäle in den Reaktionsbereichen 204 sind dabei von unveränderter Größe.

Fig.12a zeigt die Darstellung der Fig. 5c der Kreuzstruktur mit zwei Detailvarianten 12b und 12c. Das Detail 12b stellt die Struktur aus den Deckschichten 10 und 20 sowie einer mittleren Schicht 40 mit den Reaktionsbereichen in den Reaktionskanälen 201 sowie den Zuführungskanälen 202 und den Abführungskanälen 203 dar. Im Detail 12c sind die Reaktionskanäle 201 aus der Variante 12b jeweils durch eine dreischichtige Mikrostruktur ersetzt. Diese umfaßt zwei Schichten 301 und 303 zur Glättung und Stabilisierung der Zu- und Abströmung 202 und 203 sowie einer eigentlichen Reaktionsschicht 302 aus weiteren Mikrokanälen oder beispielsweise einem Glasfließ.

Fig.13 zeigt eine Anschlußvariante der Mikro-Kreuzstruktur 200 nach Fig. 4a, 4b, 4c, 4d, 4e und 5a, 5b und 5c mit zwei Mikroanströmungskanalvarianten 401 und 402. Beide Varianten verbinden einen Kanal für die Fluidversorgung 400 jeweils mit allen parallelen Kanälen 202 und 203 der beiden Ebenen. So können sämtliche Reaktionsbereiche 204 gleichzeitig auf verschiedenen Zu- und Abführungsvarianten mit Fluid gespült werden.

Fig.14 zeigt eine zu Fig.13 analoge Darstellung mit zwei in die Fluidversorgung integrierten Ventilen 500. Diese versorgen die Mikrokanalstruktur 200 über die Kanäle in der einen Ebene 202 und der anderen Ebene 203. Dadurch können die Reaktionskanäle in den Reaktionsbereichen 204 mit Fluid gespült werden. Es können ein, mehrere oder alle Reaktionsbereiche 204 gleichzeitig mit Fluid gespült werden. Durch die Ventilstellung und die Strömungsrichtung durch die Reaktionskanäle können schnell beliebige Fluidversorgungszyklen realisiert werden. Hierzu sind nur die Ventile 500 zu verstellen und mit Unter- oder Überdruck zu beaufschlagen. Auch die einheitlichen Zuführungen 400, hier mit der Kanalvariante 402, können in die Fluidzyklen integriert werden.

Fig.15a zeigt eine Ausführungsvariante des Ventils 500 aus Fig.14 mit weiteren Schnittdarstellungen 15b und 15c. Das Ventil ist horizontal in Mikrotechnik ausgeführt. Es besteht im wesentlichen aus einer Scheibe 509 und einer Platte 600. Die Platte ist mit der Mikrostruktur 200 über Kanäle 601 bis 604 verbunden, so daß wahlweise die Fluide der Zuführungskanäle bzw. der Mikrotanks hinter den Kanälen 501 bis 504 in die Kanäle 202 der Mikrostruktur gepumpt werden können. Die Zuordnung kann durch Drehen der Ventilscheibe 509 seriell verändert werden. Dieses Ventil 500 kann gemäß Fig.14 auch an beide Kanalstrukturen 202 und 203 der Kreuzstruktur 200 angeschlossen werden. Damit können die Reaktionskanäle individuell mit Fluid benetzt werden. Über eine zentrale Zuführung 510 im Ventil 500 werden analog zu den starren Zusammenführungen 401 und 402 aus Fig. 13 die einzelnen Mikrokanäle 601 bis 604 wahlweise verbunden, beispielsweise für einheitliche Bespülungen beim Reinigen oder anderen einheitlichen Schritten z.B. bei der orts aufgelösten Synthese im Reaktionsträger.

Fig.16a zeigt eine weitere Ausführungsvariante des Multiplexventils 500 mit der Schnittdarstellung 16b. Hier sind die einzelnen Versorgungskanäle 501 bis 516 kreisförmig um den Reaktionsträger 200 angeordnet. Das Prinzip entspricht Fig.15a, 15b, 15c. Es können damit jedoch mehr oder größere Anschlüsse realisiert werden. Die Scheibe 509 befindet sich wieder auf einer zweischichtigen Grundplatte 600 und 610.

Fig.17 zeigt einen fluidischen Reaktionsträger im Querschnitt, der durch eine Spannvorrichtung aufgenommen ist, die mit zwei gegenüberliegenden Spannbacken 701 und 702 mit einer integrierten Strömungsführung 703 versehen ist, wobei diese Strömungsführung in einer Strömungsebene 202 ohne Biegung etc. in den Kanälen auskommt. Die gleiche Anordnung ist auch für die Kanäle 203 möglich. Weiterhin dargestellt ist eine schmale Dichtfläche 705.

Fig.18 zeigt eine weitere Anschlußvariante mit Strömungsführung 703 mit Biegungen 704 in mindestens zwei Ebenen. Dargestellt ist weiterhin eine breite Dichtfläche 705 im Auflager 710.

Fig.19 zeigt eine weitere Anschlußvariante mit Strömungsführung 703 mit Biegungen 704 in mindestens zwei Ebenen. Mikrobeine 721 analog zu einem Prozessor aus der Halbleitertechnik verbinden den Aufnahmesockel 720 mit dem Reaktionsträger 200 bzw. den Kanälen 202. Die Kanäle 203 können analog
5 angeschlossen werden. Eine Dichtung erfolgt durch die Mikrobeine 721 durch verkleben oder einstecken.

Fig.20 zeigt am Beispiel der Mikrobeine 721 aus Fig.19 eine Hinterspülung 803 zur Vermeidung von Ablagerungen in einer Biegung der Strömung und der damit verbundenen Verschleppungsgefahr. Diese Mikrobeine 721 sind in dem
10 Reaktionsträger in der unteren Deckschicht 10 verankert. Durch die zweite Reihe an Reinigungsbeinen 801 kann gezielt Flüssigkeit über die Kanäle 802 in die Ecken 803 gespült werden und dadurch eine Ablagerung vermieden bzw. beseitigt werden.

Ansprüche

- 1 Mikrofluidischer Reaktionsträger mit einer Mehrzahl von Reaktionsbereichen, dadurch gekennzeichnet, daß dieser Reaktionsträger eine Strömungskanalstruktur für das Durchleiten von Fluiden enthält, wobei Zuführungskanäle und dazu parallele Abführungskanäle durch zu diesen unter einem Winkel angeordnete Verbindungskanäle miteinander verbunden sind und besagte Verbindungskanäle oder auch Teile der Zu- und Abführungskanäle als Reaktionsbereiche dienen.
- 2 Mikrofluidischer Reaktionsträger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Strömungskanalstruktur aus drei Strömungsebenen besteht, wobei die Zuführungskanäle zueinander parallel in einer ersten Strömungsebene liegen und die Abführungskanäle zueinander parallel in einer dritten Strömungsebene liegen und zu diesen beiden Strömungsebenen senkrecht oder annähernd senkrecht die Verbindungskanäle mit den Reaktionsbereichen liegen.
- 3 Mikrofluidischer Reaktionsträger nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß in einer zu der ersten und der dritten Strömungsebene senkrechten Projektion die Zuführungskanäle der ersten Strömungsebene die Abführungskanäle der dritten Strömungsebene unter einem Winkel kreuzen.
- 4 Mikrofluidischer Reaktionsträger nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß jeder Strömungskanal individuell über ein Ventilsystem mit Fluid beströmt und entleert werden kann.
- 5 Mikrofluidischer Reaktionsträger nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Abführung des Fluids jedes Reaktionsbereichs ohne Kontakt dieses Fluids zu den anderen Reaktionsbereichen erfolgt.
- 6 Mikrofluidischer Reaktionsträger nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Strömungskanalstruktur einseitig mit einer transparenten Deckschicht versehen ist.

- 7 Mikrofluidischer Reaktionsträger nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Strömungskanalstruktur beidseitig mit einer transparenten Deckschicht versehen ist.
- 8 Mikrofluidischer Reaktionsträger nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß die transparenten Deckschichten aus Glas oder Kunststoff bestehen und in diese Deckschichten eine Struktur von Mikrolinsen derart integriert ist, daß das einfallende Licht auf die Reaktionsbereiche fokussiert wird und das ausfallende Licht einer Nachweisreaktion entsprechend gebündelt wird.
- 9 Mikrofluidischer Reaktionsträger nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß die transparenten Deckschichten aus einer Vielzahl von parallelen verschmolzenen Glasfasern bestehen, welche derart zu einer transparenten Wabenstruktur ausgebildet sind, daß das ein- und ausfallende Licht parallelisiert und ein seitliches reflexionsbedingtes Ausbreiten des Lichtes in der Deckschicht verhindert wird.
- 10 Mikrofluidischer Reaktionsträger nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Wände zwischen den Zuführungskanälen und den Abführungskanälen lichtundurchlässig ausgeführt sind.
- 11 Mikrofluidischer Reaktionsträger nach einem der Ansprüche 2 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungskanäle aus einer Vielzahl von zusammengeschmolzenen Glasfaserbündeln bestehen, wobei die Glasfaserseelen herausgeätzt sind und somit Mikrokanäle bestehen.
- 12 Mikrofluidischer Reaktionsträger nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Glasfaserbündel mit herausgeätzten Seelen nur im Bereich der Reaktionsbereich angeordnet werden.
- 13 Mikrofluidischer Reaktionsträger nach einem der Ansprüche 2 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungsebenen aus einer Siliziumschicht bestehen, in welche eine Vielzahl von kleinen Kanälen geätzt wurde.

- 14 Mikrofluidischer Reaktionsträger nach einem der Ansprüche 2 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere Strömungsebenen so übereinander angeordnet werden, daß sich die Reaktionsbereiche in der zu den Strömungsebenen senkrechten Projektion nicht überlagern und individuell durch Licht photoaktiviert werden können und Licht ebenfalls ortsspezifisch für jeden der Reaktionsbereiche detektiert werden kann.
- 15 Mikrofluidischer Reaktionsträger nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß eine programmierbare Lichtquellenmatrix für die Synthese und Analyse in den Reaktionsträger integriert wird.
- 16 Mikrofluidischer Reaktionsträger nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß eine Detektionseinheit in Form einer CCD-Matrix in den Reaktionsträger integriert wird.
17. Mikrofluidischer Reaktionsträger nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass eine Vielzahl von jeweils unterschiedlichen Rezeptoren an spezifische Bereiche an den Träger gebunden ist.
18. Mikrofluidischer Reaktionsträger nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Rezeptoren ausgewählt sind aus Nukleinsäuren, wie DNA, RNA, Nukleinsäureanaloga, wie Peptidnukleinsäuren (PNA), Peptiden und Sacchariden.
19. Mikrofluidischer Reaktionsträger nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Rezeptoren aus einzelnen Synthesebausteinen an dem Träger synthetisiert worden sind.
20. Mikrofluidischer Reaktionsträger nach einem der Ansprüche 17 - 19, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen Rezeptor und Träger ein Baustein eingefügt ist, der eine Abspaltung des Rezeptors erlaubt.

21. Mikrofluidischer Reaktionsträger nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass nach Abspaltung des Rezeptors eine funktionelle Gruppe auf dem Träger zurückbleibt, welcher zur Synthese eines neuen Rezeptors geeignet ist.
22. Verwendung eines mikrofluidischen Reaktionsträgers nach einem der Ansprüche 6 bis 21, wobei durch die transparente Deckschicht Lumineszenz- und Fluoreszenzmessungen im Rücklichtverfahren durchgeführt werden.
23. Verwendung eines mikrofluidischen Reaktionsträgers nach einem der Ansprüche 7 bis 22, wobei jeder Reaktionsbereich über eine programmierbare Lichtquellenmatrix Licht definierter Wellenlänge ausgesetzt wird und über besagtes Licht und besagte Fluidversorgung biochemisch funktionalisiert wird und gleichzeitig über die zweite transparente Deckschicht alle Vorgänge im Reaktionsträger optisch überwacht werden.
24. Verwendung eines mikrofluidischen Reaktionsträgers nach einem der Ansprüche 7 bis 22, wobei durch die beiden transparenten Deckschichten Lumineszenz- und Fluoreszenzmessungen sowie Absorptionsmessungen im Durchlichtverfahren durchgeführt werden.
25. Verwendung eines mikrofluidischen Reaktionsträgers nach einem der Ansprüche 1 bis 22 zur naßchemischen Synthese von Oligomer- oder Polymersonden wie DNA, RNA, PNA, LNA und anderen.
26. Verwendung eines mikrofluidischen Reaktionsträgers nach einem der Ansprüche 1 bis 22 zur integrierten Synthese und Analyse von Polymeren.
27. Verwendung eines mikrofluidischen Reaktionsträgers nach einem der Ansprüche 1 bis 22 zur optischen Analyse der Hybridisierung von Polymersonden mit komplementären Fragmenten.
28. Verwendung eines mikrofluidischen Reaktionsträgers nach einem der Ansprüche 1 bis 22 zur effizienten hochparallelen kombinierten naßchemischen und lichtgesteuerten Synthese von Oligomer- oder Polymersonden wie DNA, RNA, PNA, LNA, Proteinen und anderen sowie zur anschließenden optischen Analyse der Hybridisierung mit komplementären Fragmenten.

29. Verwendung eines mikrofluidischer Reaktionsträgers nach einem der Ansprüche 1 bis 22 zur lichtgesteuerten Synthese von Oligomer- oder Polymersonden wie DNA, RNA, PNA, LNA und anderen sowie zur anschließenden optischen Analyse der Hybridisierung mit komplementären Fragmenten.
30. Verwendung eines mikrofluidischen Reaktionsträgers nach einem der Ansprüche 1 bis 22 zur individuellen Benetzung und biochemischen Funktionalisierung jedes Reaktionsbereiches im Reaktionsträger.

Fig. 1b

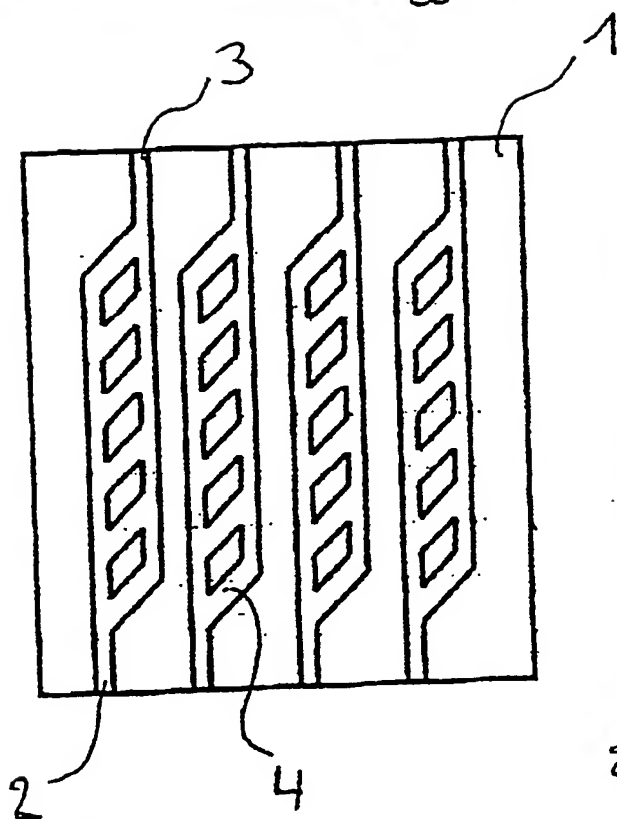
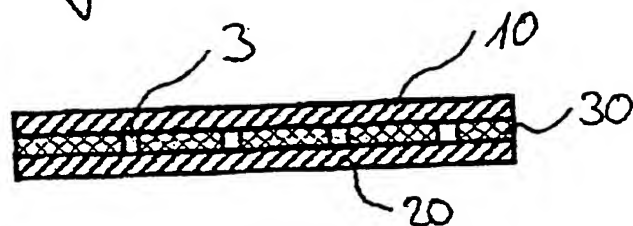
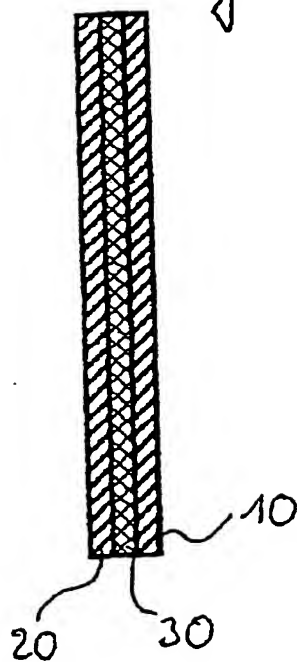
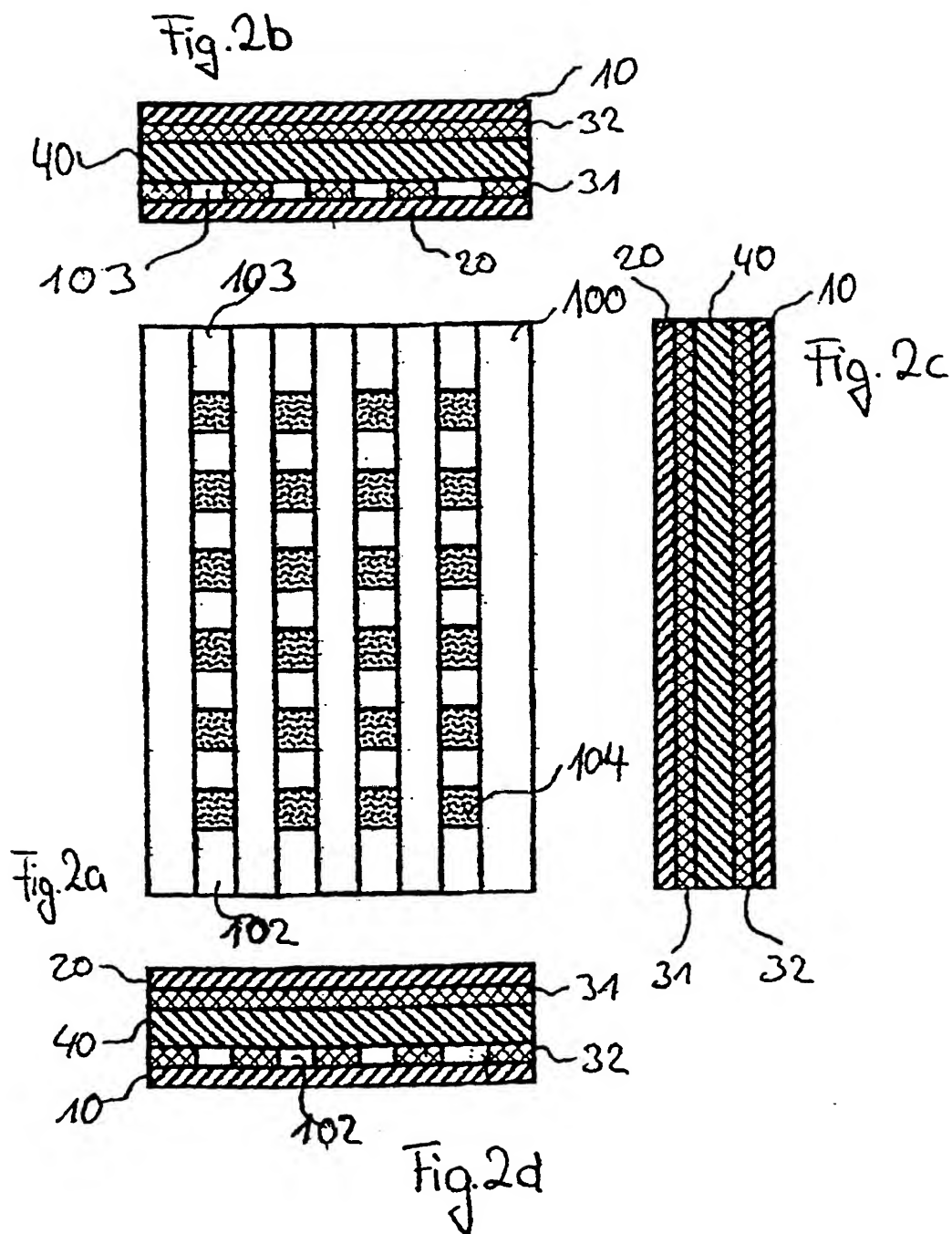


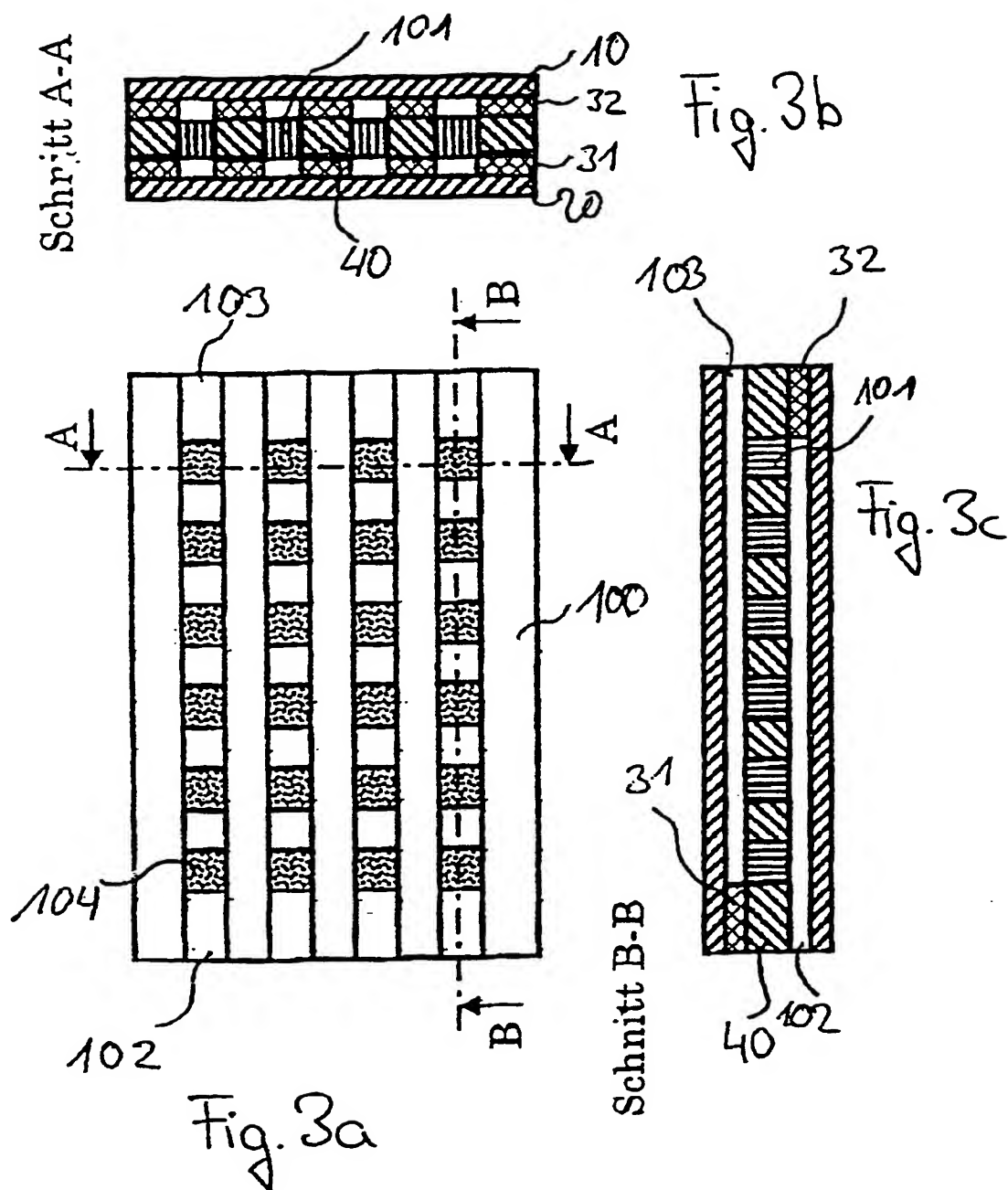
Fig. 1a

Fig. 1c

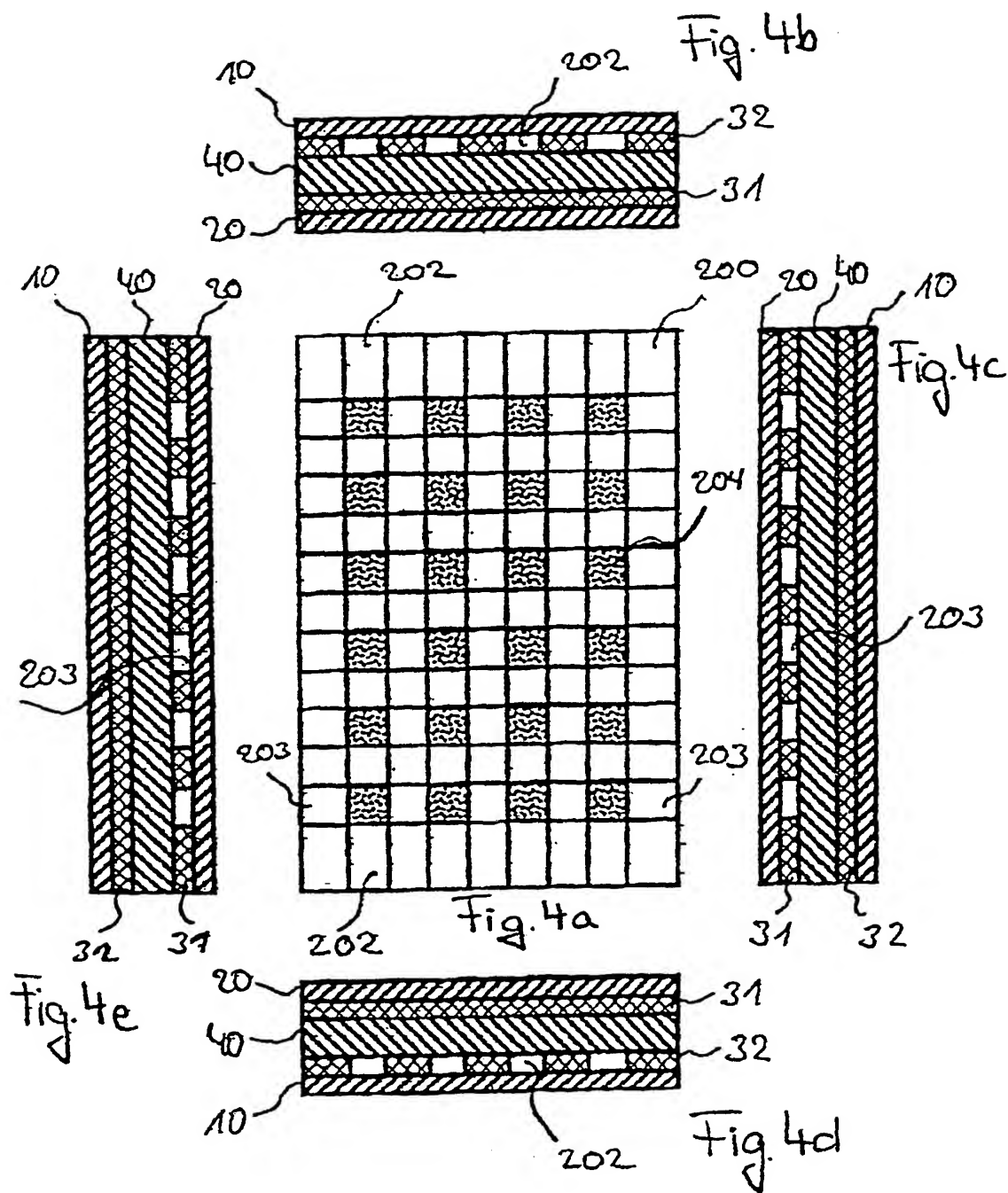




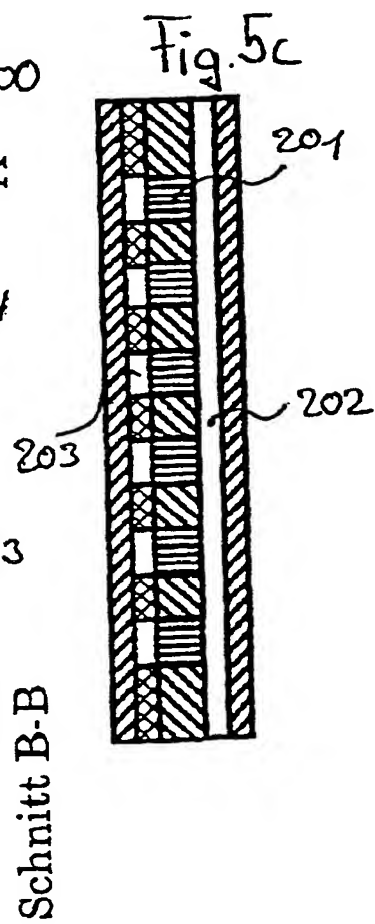
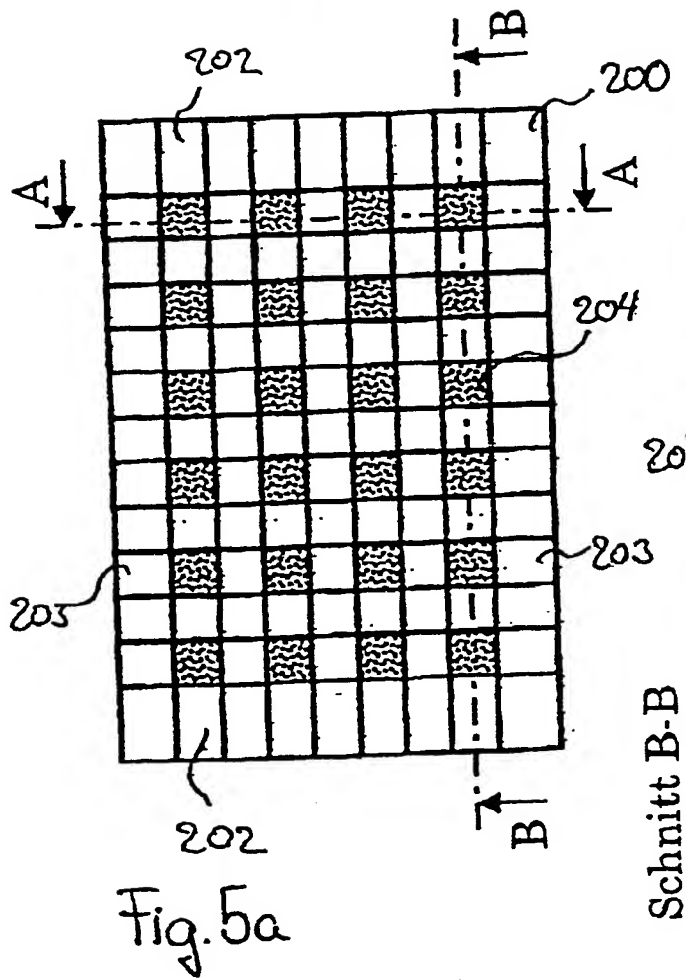
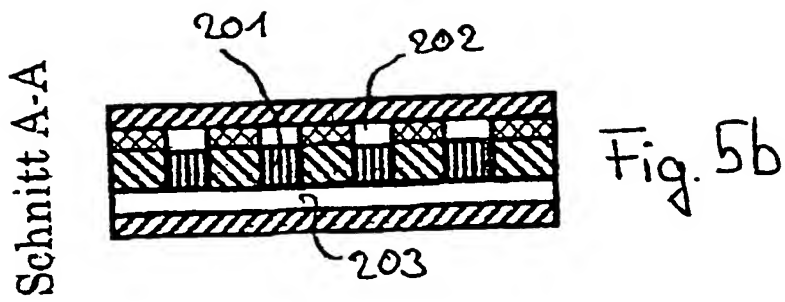












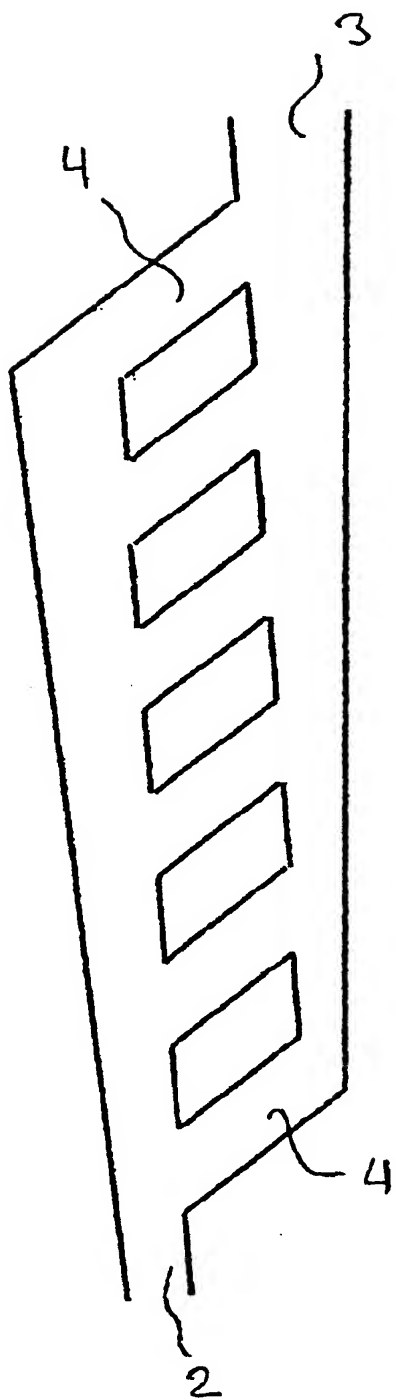


Fig. 6

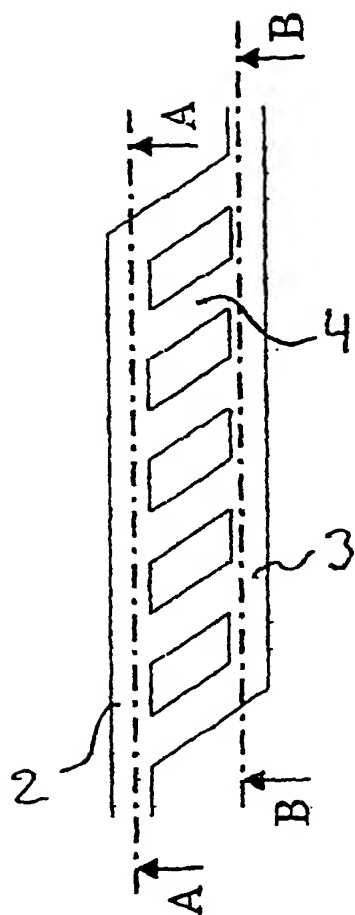


Fig. 7a

Schnitt A-A

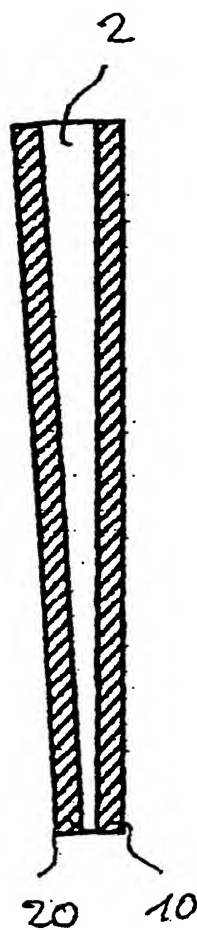


Fig. 7b

Schnitt B-B

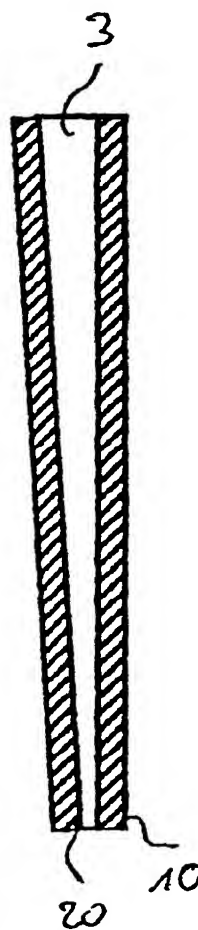


Fig. 7c

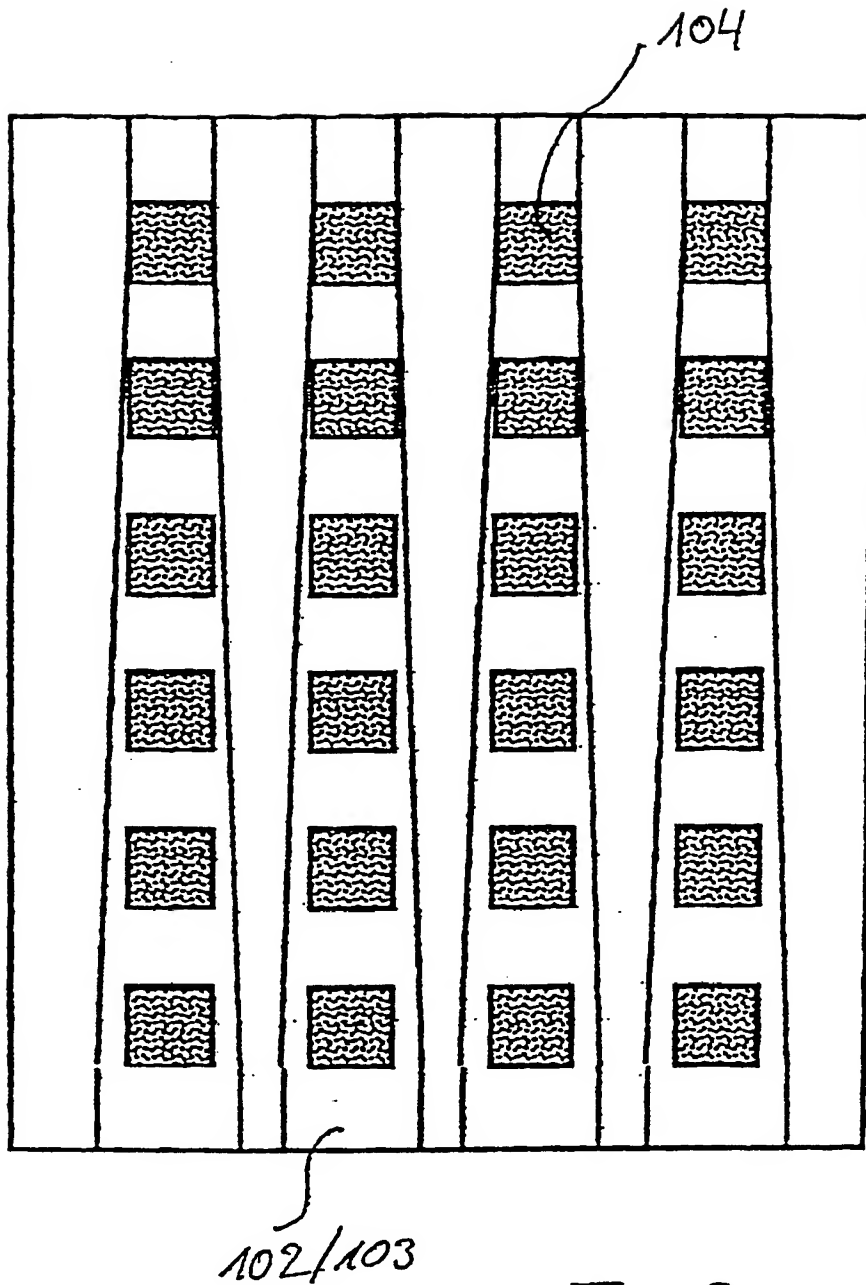


Fig. 8

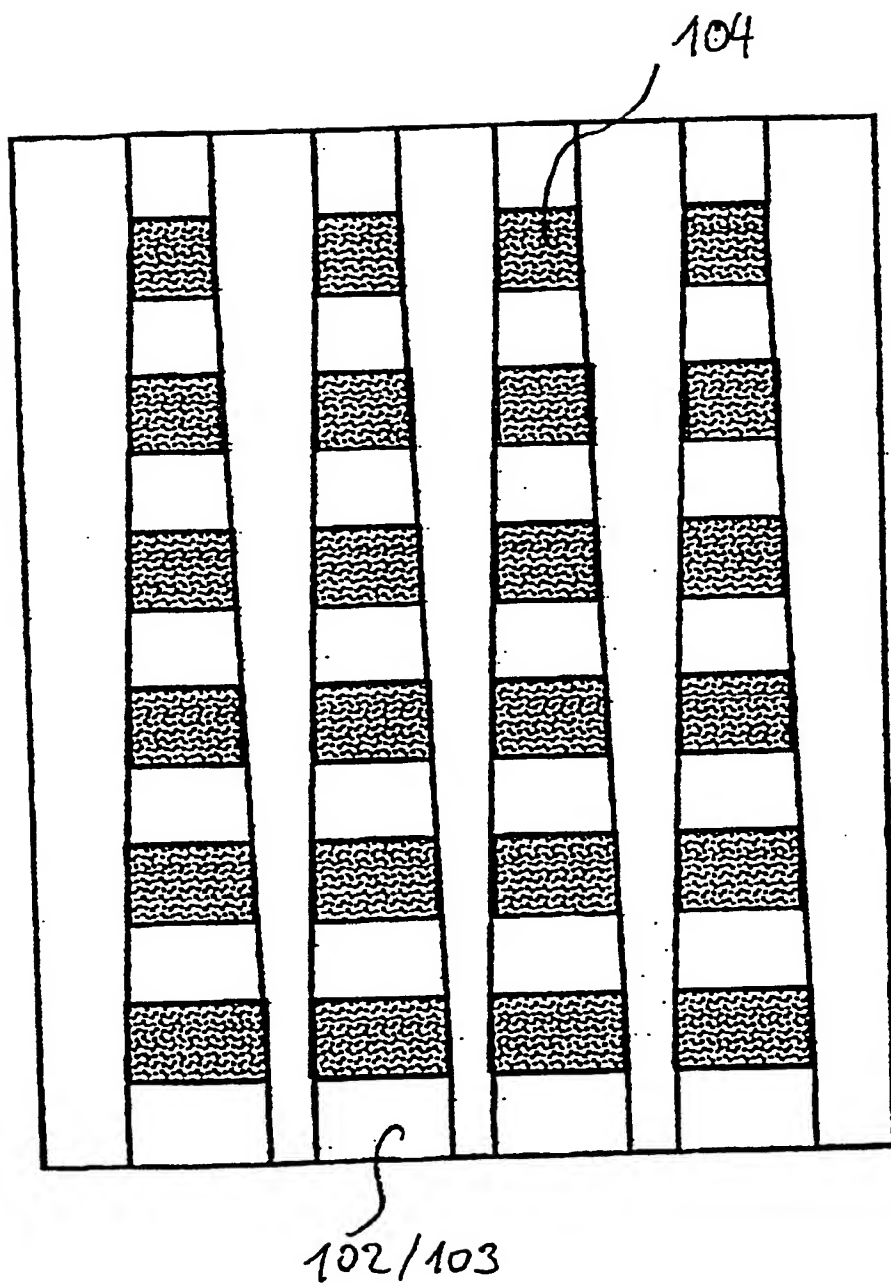


Fig. 9

10/19

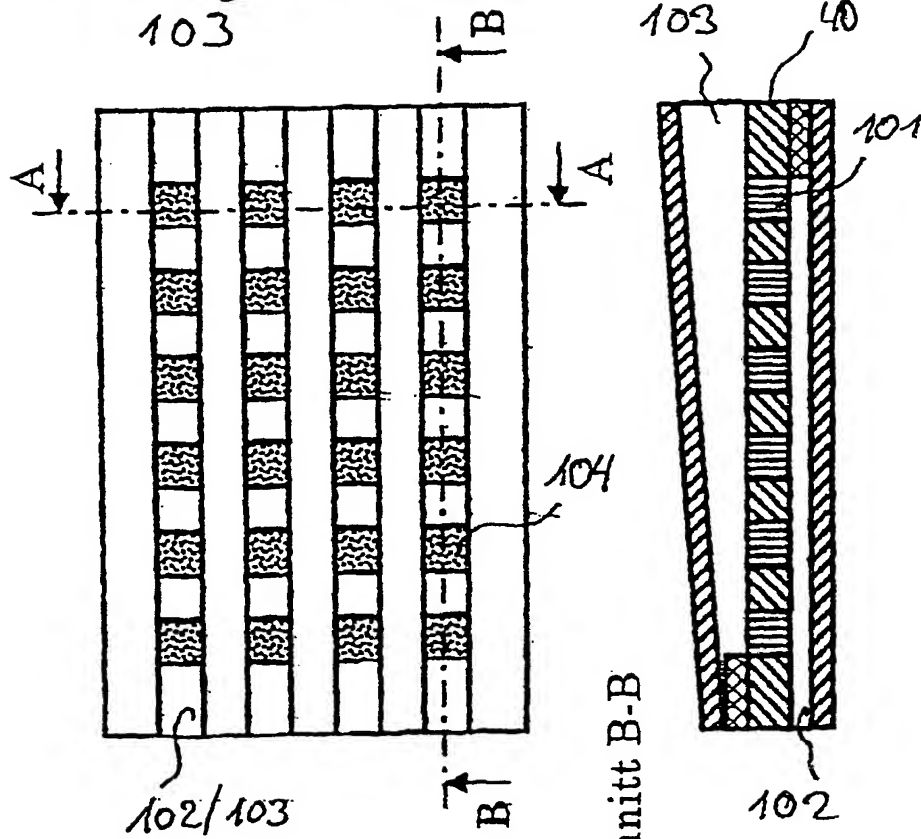
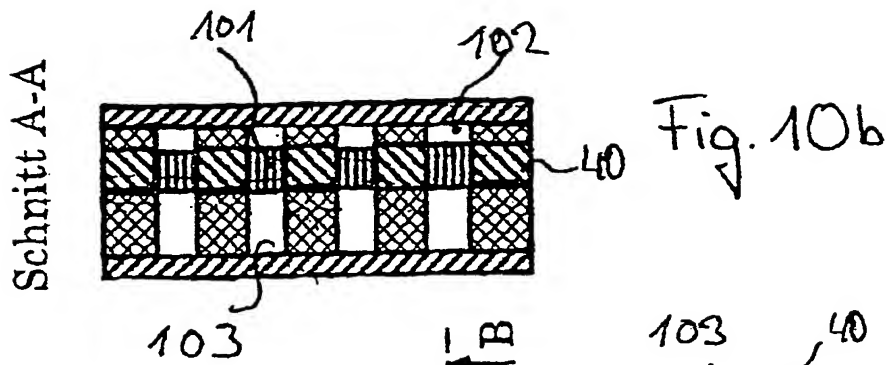


Fig. 10a

Fig. 10c

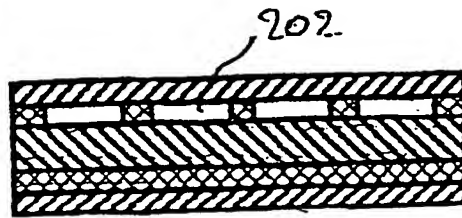


Fig. 11b

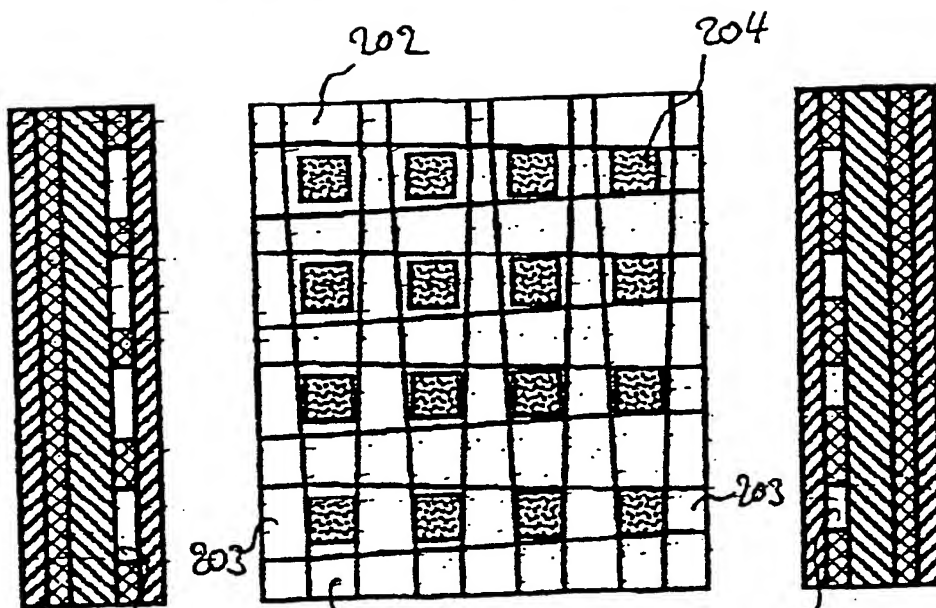


Fig. 11a

Fig. 11e

Fig. 11c

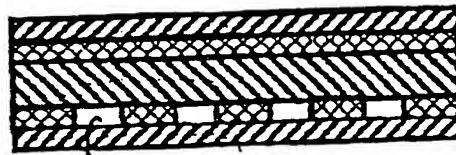
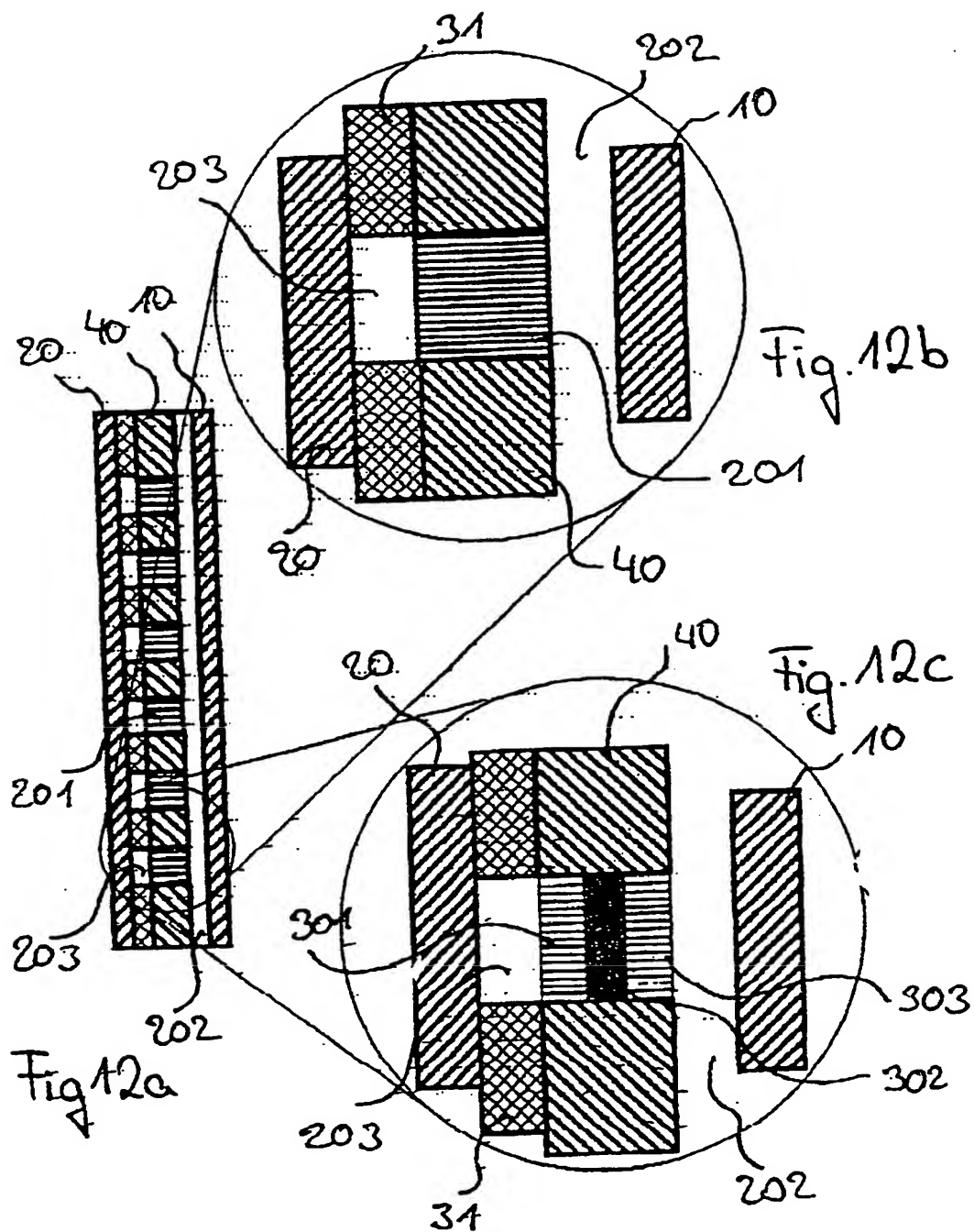


Fig. 11d

12/19



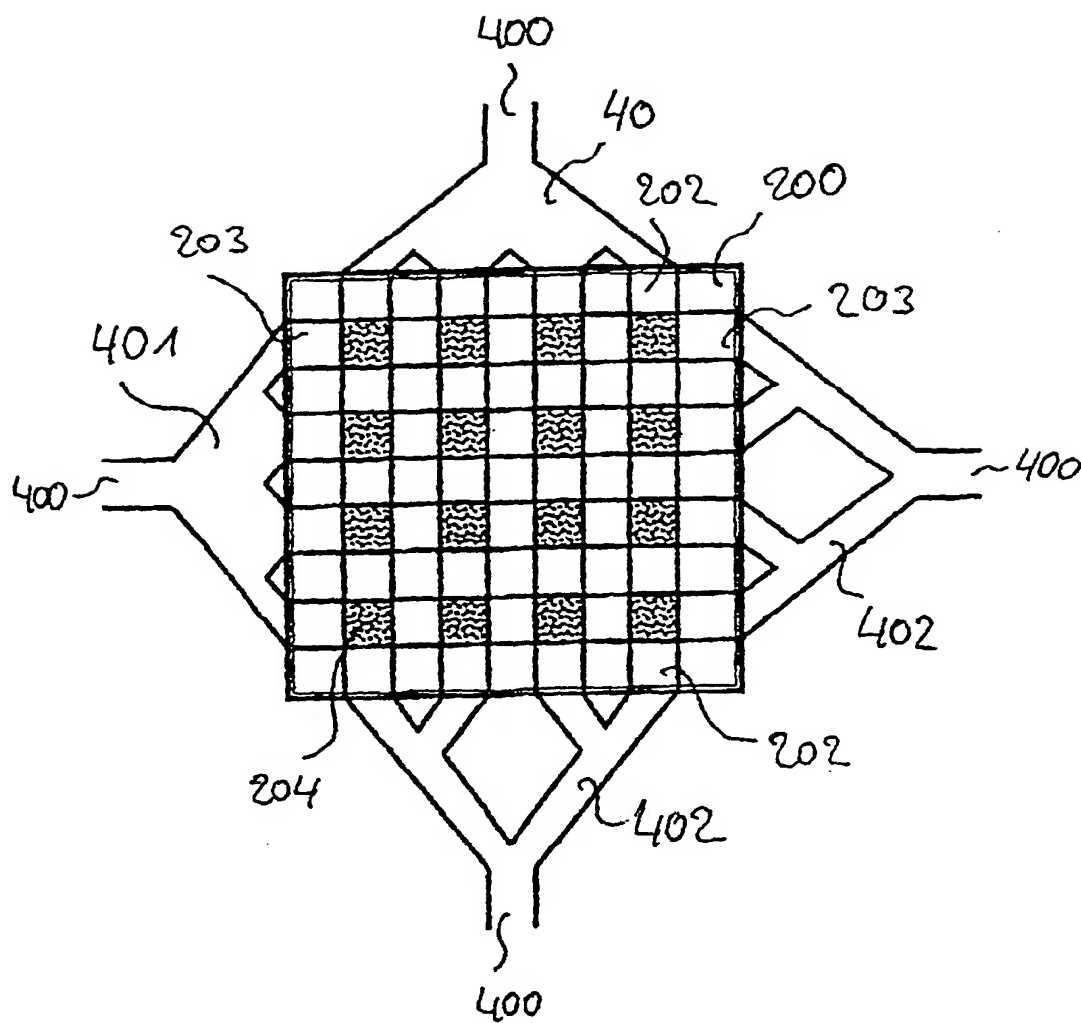


Fig. 13

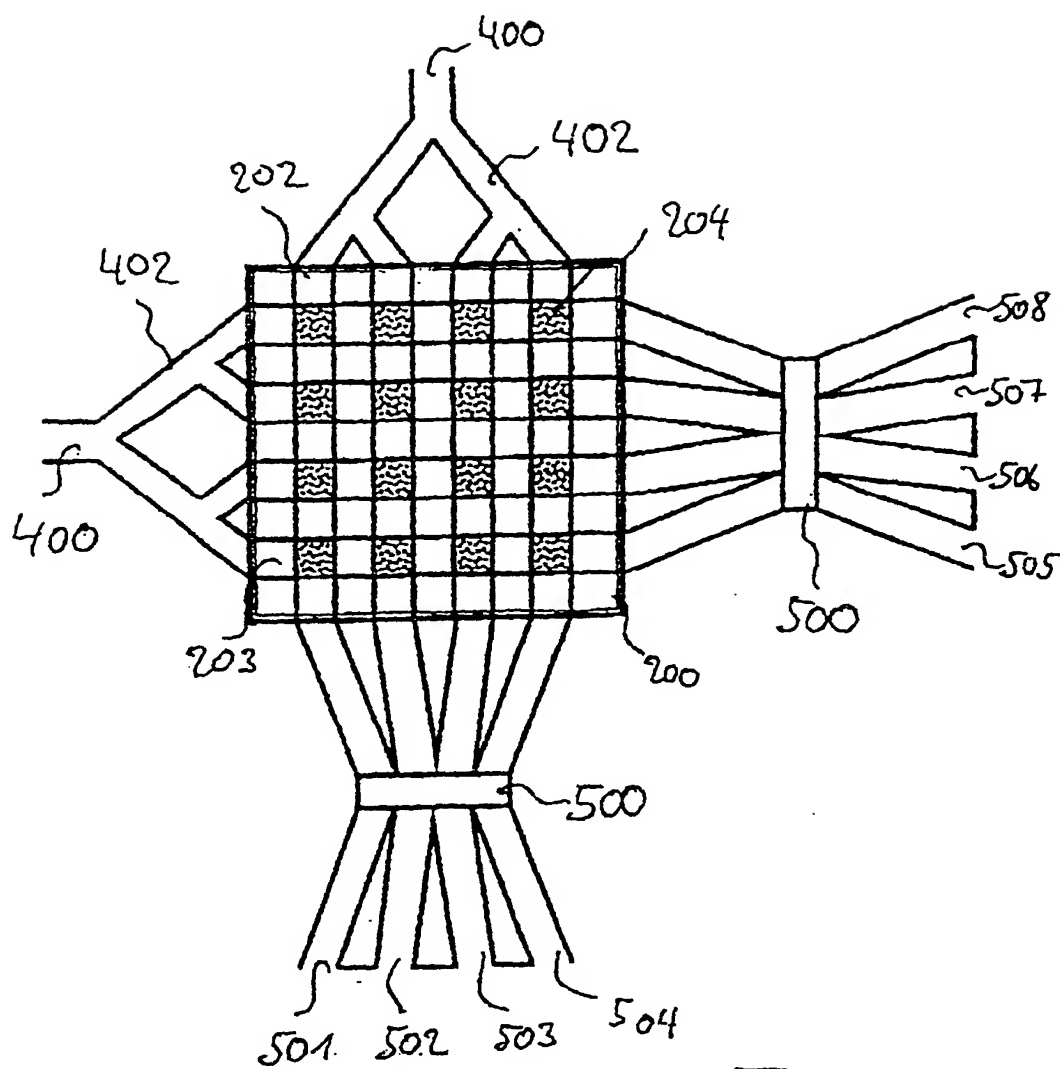
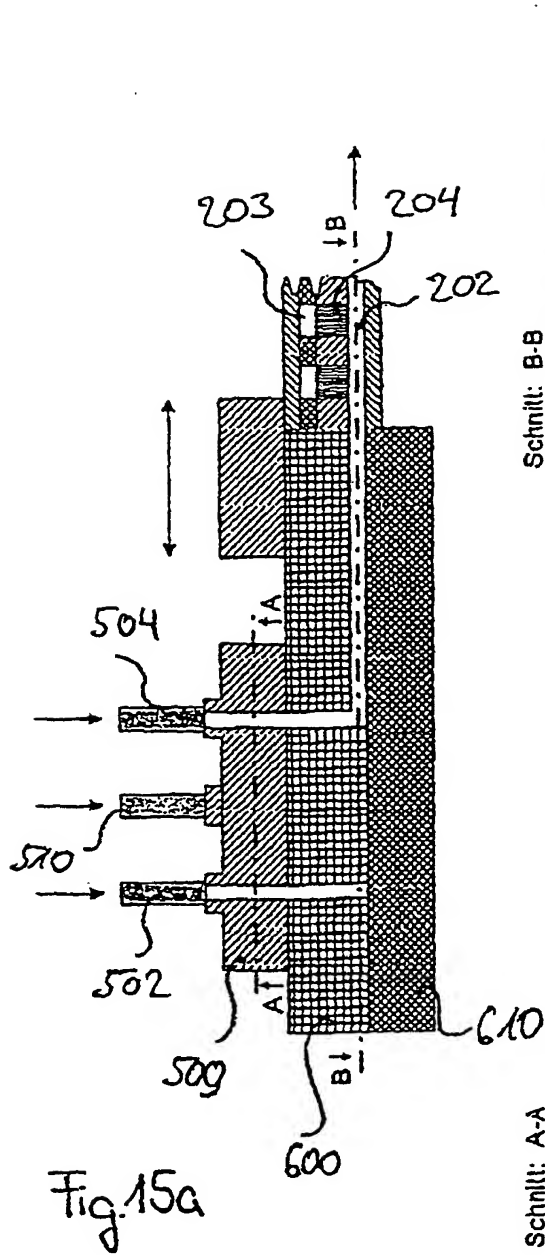
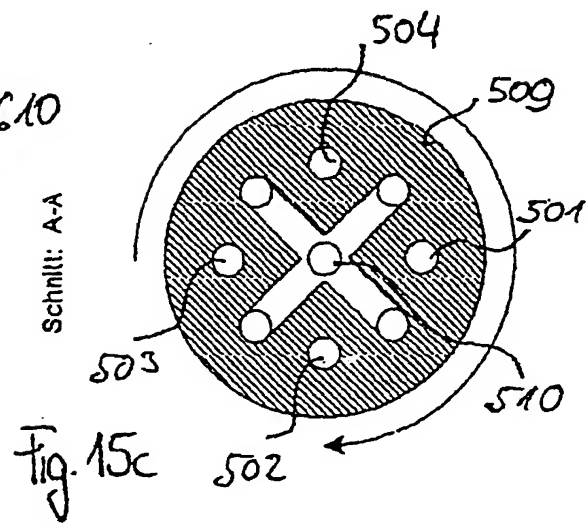
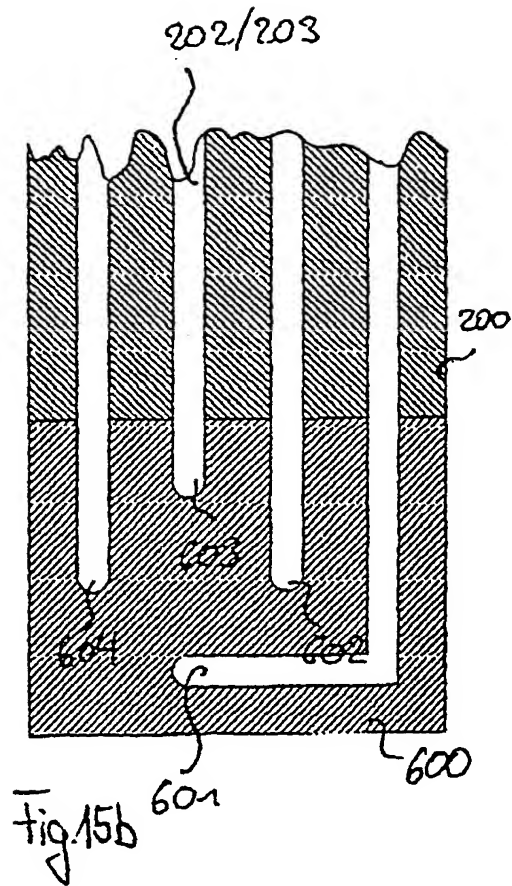


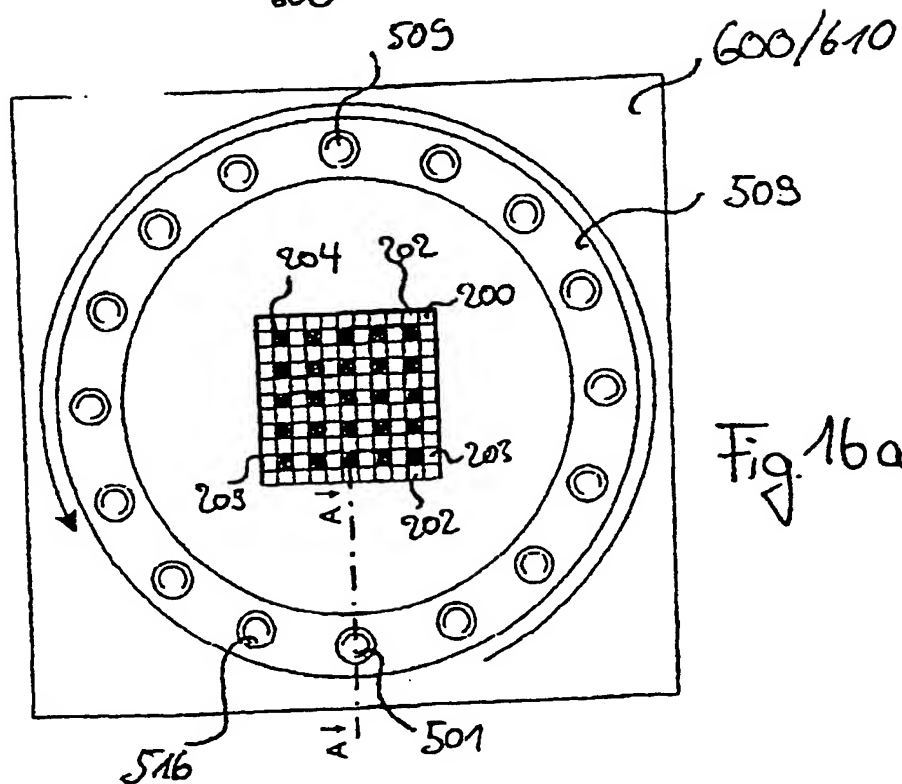
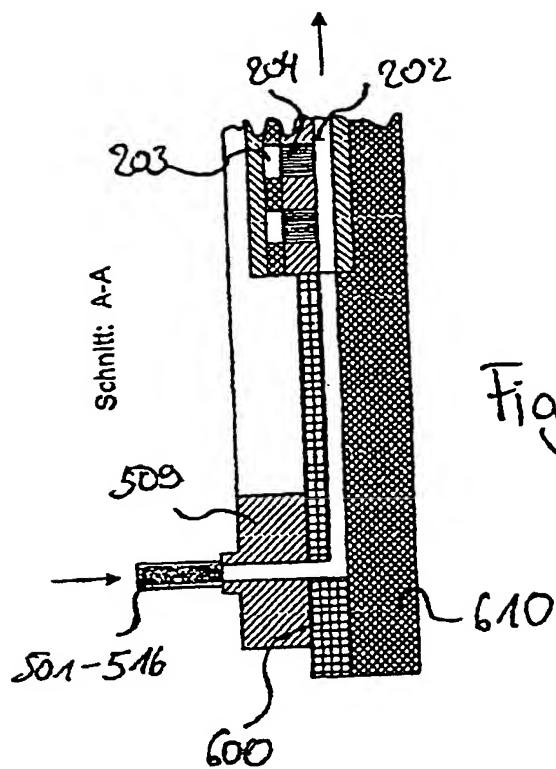
Fig. 14



Schnitt: B-B



Schnitt: A-A



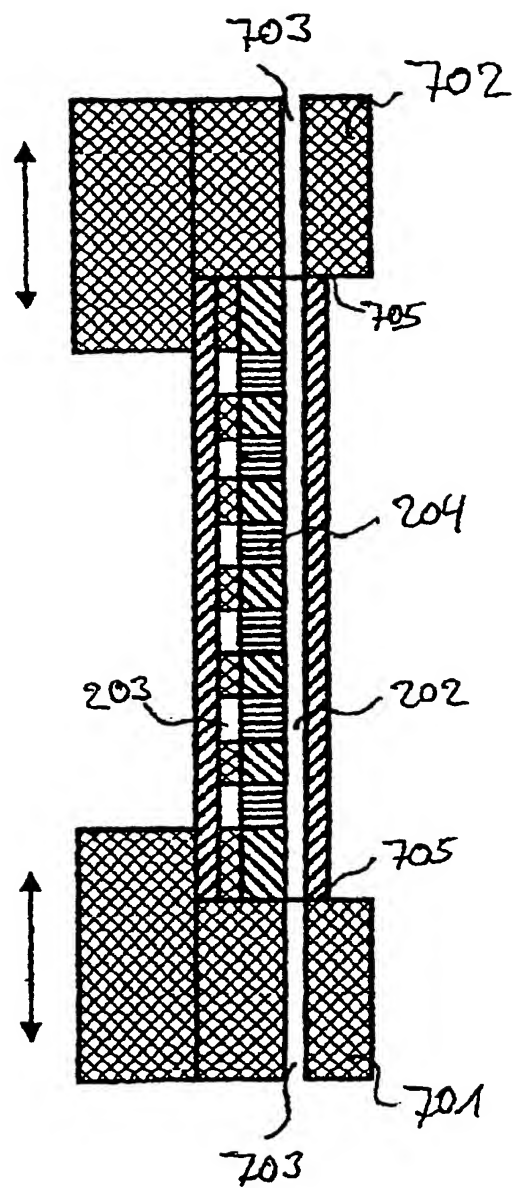


Fig. 17

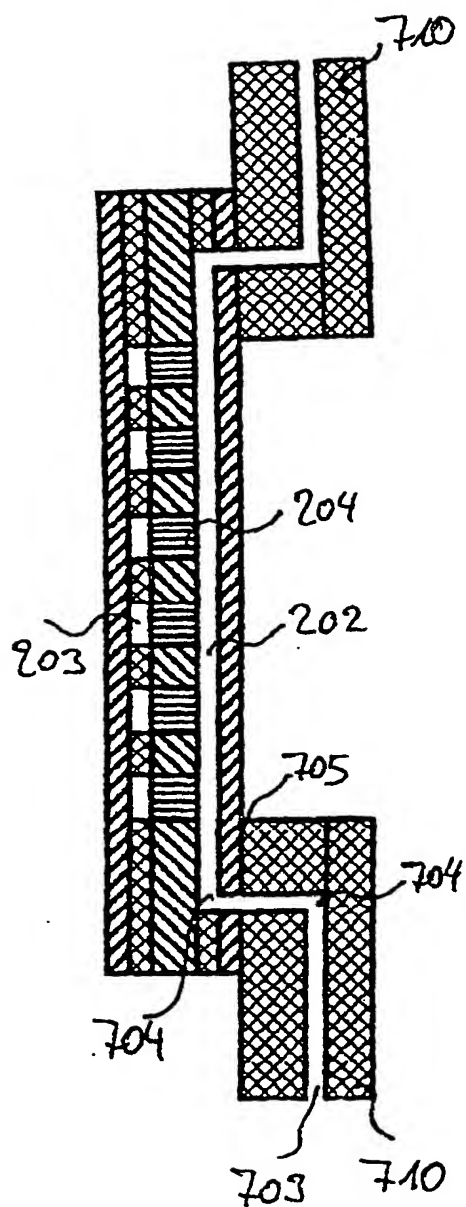


Fig. 18

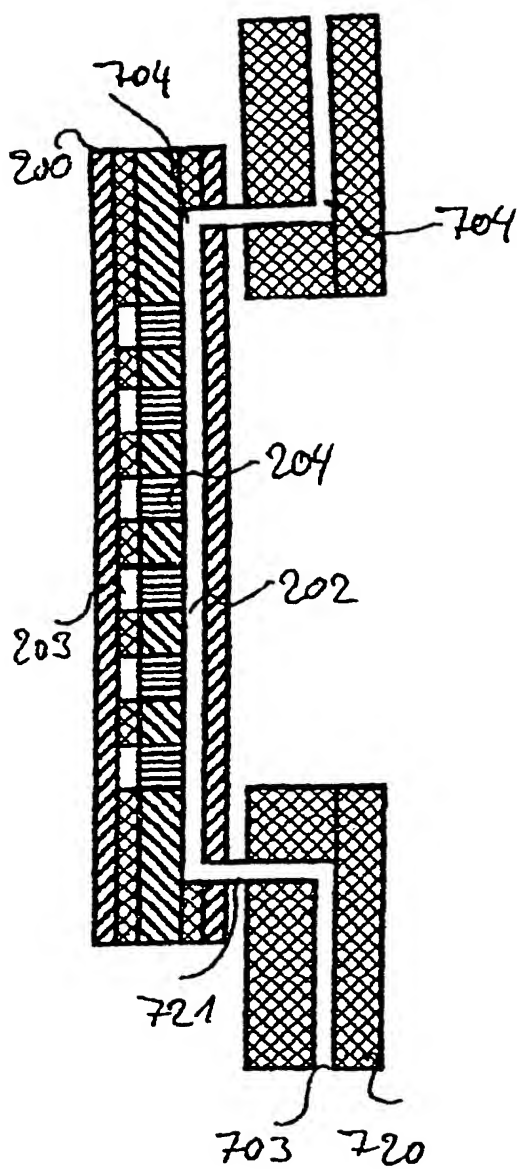


Fig. 19

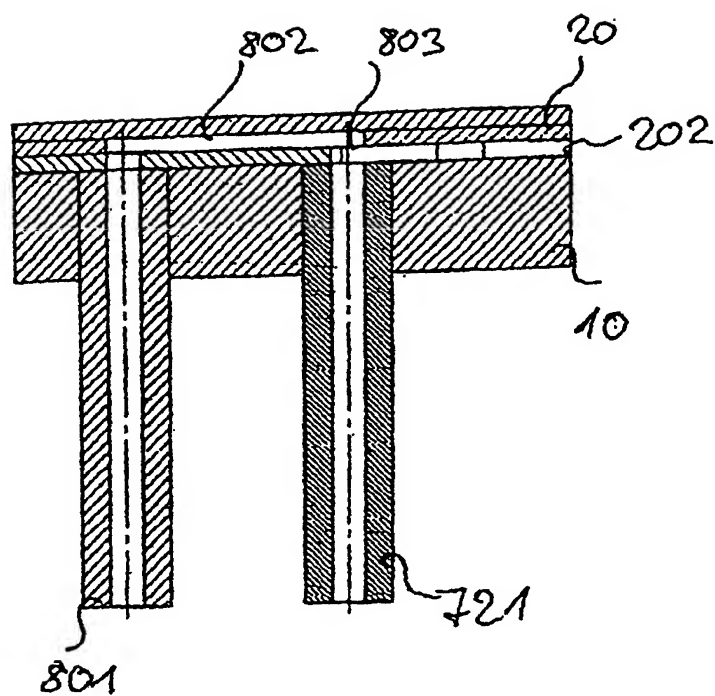


Fig. 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/07445

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 B01L3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 B01L B01J C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93 22053 A (UNIV PENNSYLVANIA) 11 November 1993 (1993-11-11)	1,4,6,7, 13,14, 17,18, 22,25,30
Y	page 5, paragraph 2 -page 10, paragraph 1 page 18, paragraph 1 -page 35, paragraph 1 examples 1-17 figures 1-5,16-21 --- -/--	16,19, 22,27

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 November 2000

Date of mailing of the international search report

21/11/2000

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Koch, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/07445

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>WO 99 14368 A (WHITEHEAD BIOMEDICAL INST) 25 March 1999 (1999-03-25) page 3, paragraphs 1,2 page 5, paragraph 2 page 10, paragraph 5 -page 11, line 12 page 18, line 5 -page 19, line 12 page 21, line 29 -page 24, line 10 page 24, line 22 -page 25, line 10 page 37, line 15 -page 38, line 17 claim 3 figures 3,4,6,7</p> <p style="text-align: center;">---</p>	16,22
X	<p>US 5 595 712 A (PERROTTO JOSEPH A ET AL) 21 January 1997 (1997-01-21) column 2, line 43 -column 2, line 58 column 4, line 33 -column 6, line 3 column 8, line 36 -column 10, line 10 figures 1-7</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-3
A		25-28
P,Y	<p>WO 99 46045 A (OSTERLOH DIRK KLAUS ;PETERS RALF PETER (DE); UENAL NEZIH (DE); BAC) 16 September 1999 (1999-09-16) page 1, paragraph 2 page 5, line 5 -page 5, line 31 page 15, line 33 -page 17, line 3 page 19, line 11 -page 19, line 25 page 20, line 1 -page 20, line 25 page 21, line 33 -page 23, line 21 page 24, line 4 -page 25, line 35 figures 1-14</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	19,27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/07445

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9322053 A	11-11-1993	US 5304487 A	19-04-1994
		US 5296375 A	22-03-1994
		AT 155711 T	15-08-1997
		AT 167816 T	15-07-1998
		AT 140025 T	15-07-1996
		AT 140880 T	15-08-1996
		AT 174813 T	15-01-1999
		AU 677780 B	08-05-1997
		AU 4222393 A	29-11-1993
		AU 680195 B	24-07-1997
		AU 4222593 A	29-11-1993
		AU 677781 B	08-05-1997
		AU 4222693 A	29-11-1993
		AU 4222793 A	29-11-1993
		AU 677197 B	17-04-1997
		AU 4223593 A	29-11-1993
		CA 2134474 A	11-11-1993
		CA 2134475 A	11-11-1993
		CA 2134476 A	11-11-1993
		CA 2134477 A	11-11-1993
		CA 2134478 A	11-11-1993
		DE 69303483 D	08-08-1996
		DE 69303483 T	06-02-1997
		DE 69303898 D	05-09-1996
		DE 69303898 T	20-02-1997
		DE 69312483 D	04-09-1997
		DE 69312483 T	12-02-1998
		DE 69319427 D	06-08-1998
		DE 69319427 T	10-12-1998
		DE 69322774 D	04-02-1999
		DE 69322774 T	17-06-1999
		EP 0637996 A	15-02-1995
		EP 0637997 A	15-02-1995
		EP 0639223 A	22-02-1995
		EP 0637998 A	15-02-1995
		EP 0637999 A	15-02-1995
		ES 2106341 T	01-11-1997
		ES 2127276 T	16-04-1999
		GR 3025037 T	30-01-1998
		GR 3029509 T	28-05-1999
		HK 16897 A	13-02-1997
		JP 7506430 T	13-07-1995
		JP 7506431 T	13-07-1995
		JP 7506256 T	13-07-1995
		JP 7506257 T	13-07-1995
		JP 7506258 T	13-07-1995
		WO 9322054 A	11-11-1993
		WO 9322421 A	11-11-1993
		WO 9322055 A	11-11-1993
		WO 9322058 A	11-11-1993
WO 9914368 A	25-03-1999	NONE	
US 5595712 A	21-01-1997	AT 173181 T	15-11-1998
		BR 9508431 A	09-06-1998
		DE 69505986 D	17-12-1998
		DE 69505986 T	20-05-1999
		EP 0772490 A	14-05-1997

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/07445

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5595712 A		JP 10503708 T WO 9603206 A	07-04-1998 08-02-1996
WO 9946045 A	16-09-1999	DE 19810499 A AU 3034099 A	16-09-1999 27-09-1999

A. KLASSTIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 B01L3/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 B01L B01J C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 93 22053 A (UNIV PENNSYLVANIA) 11. November 1993 (1993-11-11)	1, 4, 6, 7, 13, 14, 17, 18, 22, 25, 30
Y	Seite 5, Absatz 2 -Seite 10, Absatz 1 Seite 18, Absatz 1 -Seite 35, Absatz 1 Beispiele 1-17 Abbildungen 1-5, 16-21 --- -/-	16, 19, 22, 27

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

14. November 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

21/11/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Koch, A

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 99 14368 A (WHITEHEAD BIOMEDICAL INST) 25. März 1999 (1999-03-25) Seite 3, Absätze 1,2 Seite 5, Absatz 2 Seite 10, Absatz 5 -Seite 11, Zeile 12 Seite 18, Zeile 5 -Seite 19, Zeile 12 Seite 21, Zeile 29 -Seite 24, Zeile 10 Seite 24, Zeile 22 -Seite 25, Zeile 10 Seite 37, Zeile 15 -Seite 38, Zeile 17 Anspruch 3 Abbildungen 3,4,6,7 ---	16,22
X	US 5 595 712 A (PERROTTO JOSEPH A ET AL) 21. Januar 1997 (1997-01-21) Spalte 2, Zeile 43 -Spalte 2, Zeile 58 Spalte 4, Zeile 33 -Spalte 6, Zeile 3 ---	1-3
A	Spalte 8, Zeile 36 -Spalte 10, Zeile 10 Abbildungen 1-7 ---	25-28
P,Y	WO 99 46045 A (OSTERLOH DIRK KLAUS ;PETERS RALF PETER (DE); UENAL NEZIH (DE); BAC) 16. September 1999 (1999-09-16) Seite 1, Absatz 2 Seite 5, Zeile 5 -Seite 5, Zeile 31 Seite 15, Zeile 33 -Seite 17, Zeile 3 Seite 19, Zeile 11 -Seite 19, Zeile 25 Seite 20, Zeile 1 -Seite 20, Zeile 25 Seite 21, Zeile 33 -Seite 23, Zeile 21 Seite 24, Zeile 4 -Seite 25, Zeile 35 Abbildungen 1-14 -----	19,27

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/07445

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9322053	A	11-11-1993	US	5304487 A	19-04-1994
			US	5296375 A	22-03-1994
			AT	155711 T	15-08-1997
			AT	167816 T	15-07-1998
			AT	140025 T	15-07-1996
			AT	140880 T	15-08-1996
			AT	174813 T	15-01-1999
			AU	677780 B	08-05-1997
			AU	4222393 A	29-11-1993
			AU	680195 B	24-07-1997
			AU	4222593 A	29-11-1993
			AU	677781 B	08-05-1997
			AU	4222693 A	29-11-1993
			AU	4222793 A	29-11-1993
			AU	677197 B	17-04-1997
			AU	4223593 A	29-11-1993
			CA	2134474 A	11-11-1993
			CA	2134475 A	11-11-1993
			CA	2134476 A	11-11-1993
			CA	2134477 A	11-11-1993
			CA	2134478 A	11-11-1993
			DE	69303483 D	08-08-1996
			DE	69303483 T	06-02-1997
			DE	69303898 D	05-09-1996
			DE	69303898 T	20-02-1997
			DE	69312483 D	04-09-1997
			DE	69312483 T	12-02-1998
			DE	69319427 D	06-08-1998
			DE	69319427 T	10-12-1998
			DE	69322774 D	04-02-1999
			DE	69322774 T	17-06-1999
			EP	0637996 A	15-02-1995
			EP	0637997 A	15-02-1995
			EP	0639223 A	22-02-1995
			EP	0637998 A	15-02-1995
			EP	0637999 A	15-02-1995
			ES	2106341 T	01-11-1997
			ES	2127276 T	16-04-1999
			GR	3025037 T	30-01-1998
			GR	3029509 T	28-05-1999
			HK	16897 A	13-02-1997
			JP	7506430 T	13-07-1995
			JP	7506431 T	13-07-1995
			JP	7506256 T	13-07-1995
			JP	7506257 T	13-07-1995
			JP	7506258 T	13-07-1995
			WO	9322054 A	11-11-1993
			WO	9322421 A	11-11-1993
			WO	9322055 A	11-11-1993
			WO	9322058 A	11-11-1993
<hr/>					
WO 9914368	A	25-03-1999	KEINE		
<hr/>					
US 5595712	A	21-01-1997	AT	173181 T	15-11-1998
			BR	9508431 A	09-06-1998
			DE	69505986 D	17-12-1998
			DE	69505986 T	20-05-1999
			EP	0772490 A	14-05-1997

INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/07445

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5595712 A		JP 10503708 T	07-04-1998
		WO 9603206 A	08-02-1996
WO 9946045 A	16-09-1999	DE 19810499 A	16-09-1999
		AU 3034099 A	27-09-1999